

Tesis de Posgrado

Acción de las prostaglandinas endógenas y exógenas en la motilidad espontánea y respuesta adrenérgica del útero aislado de rata

Chaud, Marcela Alicia

1985

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Chaud, Marcela Alicia. (1985). Acción de las prostaglandinas endógenas y exógenas en la motilidad espontánea y respuesta adrenérgica del útero aislado de rata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1894_Chaud.pdf

Cita tipo Chicago:

Chaud, Marcela Alicia. "Acción de las prostaglandinas endógenas y exógenas en la motilidad espontánea y respuesta adrenérgica del útero aislado de rata". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1985.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1894_Chaud.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Acción de las prostaglandinas endógenas y exógenas en
la motilidad espontánea y respuesta adrenérgica del
útero aislado de rata

Autor: Lic. Marcela Alicia Chaud

Director de tesis: Dra. Martha F. de Gimeno

Lugar de trabajo: Centro de Estudios Farmacológicos y de Principios
Naturales. CONICET

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

1995

1995-12-10

- 1894 -
ef. 2

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por otorgarme las becas que me permitieron investigar en este tema.

Al Centro de Estudios Farmacológicos y de Principios Naturales (CEFAPRIN), que me proporcionó los medios para efectuar esta tesis.

A la Dra. Martha Gimeno, por su amistad y por la dirección en este trabajo de investigación.

Al Dr. Enri Borda por su participación en la realización del presente trabajo.

Al Dr. Alvaro Gimeno, por su asesoramiento en la elaboración del mismo.

A mis compañeros: Elida González, Marcelo Viggiano y Ana Franchi por su colaboración; y a Horacio Peredo, Alicia Falletti, Gabriela Dveksler y María Isabel B. de Ferrón por su constante apoyo.

A los colaboradores inocentes que fueron sacrificados para
hacer posible este trabajo: las ratas.

INDICE

CAPITULO I: INTRODUCCION

1. Utero de rata

- 1.1 Aspectos anatómico-histológicos..... 1
- 1.2 Aspectos funcionales..... 5
 - 1.2.1 Características electrofisiológicas..... 5
 - 1.2.2 Eventos moleculares de la contracción
muscular..... 6
 - 1.2.3 Influencia hormonal..... 9

2. Unión neuroefectora adrenérgica

- 2.1 Generalidades.....17
- 2.2 Participación de las prostaglandinas en la neuro-
transmisión adrenérgica.....32
- 2.3 Papel de las catecolaminas en la contracción
y relajación del músculo liso..... 36

3. Prostaglandinas

- 3.1 Generalidades..... 40
- 3.2 Estructura química..... 41
- 3.3 Biosíntesis..... 47

3.4 Metabolismo.....	55
3.5 Inhibidores.....	58
3.6 Receptores.....	63
3.7 Influencia de las hormonas sexuales en la biosíntesis uterina de prostaglandinas.....	64
3.8 Papel de las prostaglandinas en la motilidad uterina.....	66

CAPITULO II: MATERIALES Y METODOS

1. Materiales

1.1 Animales utilizados.....	68
1.2 Drogas utilizadas.....	69

2. Métodos

2.1 Determinación de la motilidad uterina.....	71
2.2 Técnicas biométricas y radiométricas.....	77
2.2.1 Cuantificación de prostaglandinas.....	77
a. Determinación de PGs tipo E y F	77
b. Determinación de PG tipo I ₂	80
2.2.2 Determinación de la Kd y N° de sitios de unión específicos para dihidroalprenolol (DHA ³ H)	81
2.2.3 Medición de la captación de norepinefrina (NE) ³ H.....	84
2.3 Método estadístico	86

CAPITULO III: RESULTADOS

1. Participación de las prostaglandinas en la motilidad uterina

- 1.1 Producción de PGs tipo E y F por cuernos uterinos aislados de ratas en distintos estadios del ciclo sexual..... 87
- 1.2 Producción de PG tipo I_2 por segmentos uterinos "in vitro" 88
- 1.3 Caracterización de la motilidad espontánea del útero aislado de ratas en los distintos estadios del ciclo sexual..... 88
- 1.4 Efecto de inhibidores de síntesis de PGs sobre la motilidad espontánea del útero de rata aislado en distintos estadios del ciclo sexual..... 93
- 1.5 Acción de PGs exógenas sobre la motilidad uterina.. 96
- 1.6 Correlación entre liberación de PGs y motilidad uterina..... 100

2. Influencia de hormonas sexuales en la motilidad y liberación de prostaglandinas

- 2.1 Producción de PGs tipo E y F por cuernos uterinos aislados de ratas inmaduras. Efecto de estradiol y progesterona..... 102

2.2 Caracterización de la motilidad espontánea de cuernos uterinos aislados de ratas inmaduras.	
Efecto de estradiol y progesterona.....	103
2.3 Efecto de Inhibidores de síntesis de PGs sobre la motilidad espontánea del útero aislado de rata inmadura.....	107
3. <u>Influencia de las prostaglandinas en la respuesta adrenérgica del útero aislado de rata</u>	
3.1 Efecto de agonistas de adrenorreceptores sobre la motilidad espontánea de cuernos uterinos aislados de rata en diferentes estadios del ciclo sexual...	111
3.2 Correlación entre la acción beta adrenoceptiva de las catecolaminas y la liberación de PGs al medio de incubación.....	112
3.3 Efecto de concentraciones subumbrales de PGF y PGE sobre la respuesta del útero aislado de rata en metaestro a norepinefrina.....	115
3.4 Determinación de sitios de unión específicos y constante de disociación para DHA^3H .	
Efecto de PGF_2 alfa.....	120
3.5 Medición de la captación de NE^3H por segmentos uterinos. Efecto de PGF_2 alfa.....	123

CAPITULO IV:

Discusión..... 130

CAPITULO V:

Conclusiones..... 149

Referencias bibliográficas..... 151

CAPITULO I

INTRODUCCION

1. Utero de rata

1.1 Aspectos anatómico-histológicos

El útero de los Euterios puede presentarse con una serie de variaciones: simple, bicornes, bipartito o duplex. Ciertos autores ubican al útero de la rata dentro de la última categoría (209)(193). Otros, consideran que es del tipo bicornes (68)(91).

Ambos cuernos uterinos desembocan en el extremo superior de la vagina y se relacionan con los ovarios mediante sendas trompas de Fallopio u oviductos(68).

La pared del útero esta integrada por 3 capas: la serosa o cubierta peritoneal del órgano, una capa de músculo liso o miometrio, que constituye la mayor parte del espesor del útero y por último, el endometrio o membrana mucosa glandular que tapija su luz (33).

Las fibras musculares lisas de la capa muscular están dispuestas en haces aplanados o cilíndricos, separados por delgados tabiques de tejido conjuntivo con células musculares aisladas. Según la dirección y disposición de los haces se pueden distinguir varias capas en el miometrio (33).

Mark (169) describió las distintas capas musculares que componen la pared del útero de rata. Observó, una capa muscular longitudinal externa constituida por haces de fibras cilíndricas

estrechamente unidas en figuras imbricadas y una capa muscular interna que consiste en una formación continua de fibras ordenadas laxamente.

El citoplasma de las fibras musculares lisas presenta miofibrillas dispuestas longitudinalmente, cuyo deslizamiento de unas sobre otras provoca el acortamiento de las células al igual que en las fibras esqueléticas (234)

Existen dos estructuras que son características de la membrana de las fibras musculares lisas: las bandas densas, son áreas de material denso ubicados en la membrana del lado citoplasmático que sirven de anclaje a los filamentos, y las caveolas que son pequeñas invaginaciones de la membrana asociadas a túbulos y sacos del retículo endoplasmático (81)

El material intercelular es abundante en elastina y colágeno, éste último presente fundamentalmente en forma de fibrillas. El contenido de colágeno en las células musculares lisas es mucho mayor que en las esqueléticas (80).

El endometrio está formado por un epitelio superficial cilíndrico simple que sufre invaginaciones, originando numerosas glándulas uterinas tubulares que se prolongan hacia una lámina propia muy gruesa llamada estroma (33)

Dentro del miometrio corren circunferencialmente hacia la línea media, donde se anastomosan, las arterias arciformes. Ramas de estas arterias, alcanzan al endometrio desprendiendo otras ramas llamadas arterias basales. Las últimas se hacen

contorneadas al penetrar en la capa mas gruesa o funcional y se ramifican para formar un rico lecho capilar en la superficie del endometrio. Durante el ciclo sexual, las arterias contorneadas se contraen y dilatan rítmicamente de modo que la superficie del endometrio enrojece y empalidece alternadamente (33).

Las ratas y ratones presentan un ciclo estral de 4 ó 5 días. En su transcurso, el endometrio y la vagina sufren modificaciones morfológicas y funcionales. Long y Evans (164), idearon un método para diagnosticar rápidamente las fases del ciclo estral sobre la base de los diferentes tipos celulares presentes en los frotis vaginales de rata.

Durante el estro o período de celo, se produce la ovulación. El útero se alarga, haciéndose edematoso y las glándulas uterinas se activan en preparación para la implantación. La mucosa vaginal prolifera y las capas epiteliales superficiales se hacen escamosas y cornificadas adecuándose a la copulación. Los frotis vaginales realizados en esta etapa contienen células escamosas características que diagnostican la fase estral del ciclo.

Durante el metaestro el diámetro de los cuernos se reduce, el epitelio toma aspecto pseudoestratificado, disminuye la vascularización y la actividad de las glándulas uterinas. Los extendidos vaginales presentan leucocitos junto con células escamosas, indicando gran delgadez de la mucosa y la migración de leucocitos a través de ella.

En proestro, que es una etapa de preparación para el próximo estro, el útero comienza a llenarse de fluido y entran en actividad las glándulas uterinas. En los frotis vaginales se observan células epiteliales nucleadas (no cornificadas) que pueden soltarse aisladamente ó en bandas (119).

El útero presenta inervación colinérgica y adrenérgica (5). Las fibras colinérgicas se originan en el ganglio paracervical contribuyendo directamente a la inervación del útero (139). La inervación adrenérgica se halla asociada a vasos sanguíneos y células musculares (195). Está constituida por las típicas neuronas postganglionares largas, cuyos cuerpos celulares están en los ganglios lumbar y mesentérico y por neuronas postganglionares cortas que tienen su origen en los ganglios pélvicos localizados en ó cerca del órgano efector (233) (117). Las neuronas adrenérgicas cortas parecen ser además características y abundantes en otras zonas del tracto reproductivo de la mayoría de los mamíferos tales como las regiones ístmicas y ampulares de oviducto (172). Paton ha sugerido (205) que esa inervación podría estar implicada en la regulación de la motilidad del oviducto y el transporte del óvulo.

Estas neuronas llamadas cortas, difieren de las típicas neuronas adrenérgicas largas tanto anatómica como funcionalmente (172). Una de esas diferencias es su capacidad para reaccionar ante la administración de estrógenos. Luego de un tratamiento con 17-beta estradiol puede observarse un incremento en la densidad y

contenido del neurotransmisor en los axones (117).

La estructura fina de las fibras adrenérgicas preterminales uterinas se asemeja a la de axones adrenérgicos en otros tejidos, ya que presentan también varicosidades terminales y preterminales con gránulos pequeños (30-60 nm) y grandes (70-120 nm). La distancia entre los terminales nerviosos y las células musculares uterinas varía con la especie animal, en conejo es de 200 nm, mientras que en rata y gato oscila alrededor de 20 nm. La implicancia fisiológica de este arreglo anatómico sugiere un control neurogénico del miometrio, mayor en el gato y la rata que en el conejo (232) (238).

1.2 Aspectos funcionales

1.2.1 Características electrofisiológicas

El miometrio pertenece a la categoría de músculos lisos denominados " unitarios " por Bozler (38). Estos se caracterizan por poseer actividad espontánea, la cual se inicia en algunas áreas especializadas del tejido ó " marcapaso ". Las contracciones en este tipo de músculos no son necesariamente iniciadas por el impulso nervioso, aunque pueden ser coordinadas y reguladas por mediación nerviosa.

La actividad espontánea del miometrio es precedida por la actividad eléctrica desarrollada en forma de descargas periódicas de potenciales de acción de tipo espiga (55). Se puede verificar en ciertas células y a diferentes tiempos una lenta

despolarización previa a la descarga de potenciales de acción. Este fenómeno sería el responsable de la actividad marcapaso (170). El marcapaso uterino no está restringido a una zona especializada como sucede en músculo cardíaco, sino que en él todas sus células musculares pueden presentar actividad marcapaso. El miometrio actúa como un sincisio eléctrico que propaga los potenciales de acción (55) (122). Experimentos realizados con microelectrodos intracelulares indican que la estimulación de una célula produce una despolarización localizada en las membranas de células adyacentes (190). Sin embargo, se ha observado poca sincronización de las espigas individuales (55).

La frecuencia, la amplitud y la duración de las contracciones están gobernadas por la frecuencia con que se descargan los potenciales de acción, por la duración de la serie de potenciales de acción originados en la célula muscular y por el número total de células estimuladas y sincrónicamente activas (121).

1.2.2 Eventos moleculares de la contracción muscular

Wilkie (267) en 1956, a partir de sus estudios sobre las propiedades mecánicas del músculo liso, sugirió la existencia de una serie de componentes celulares elásticos, a pesar de que su organización estructural y naturaleza química no era conocida.

Este campo ha sido objeto de intensos estudios y es cono-

cido actualmente (189) que los músculos lisos presentan miosina dispuesta en forma de agregados constituyendo los filamentos gruesos y monómeros globulares de actina, que se asocian entre sí formando largas cadenas enrolladas helicoidalmente de apares, visualizadas como filamentos finos. Estos filamentos finos, además de actina, poseen tropomiosina, aunque la troponina presente en los filamentos finos del músculo estriado está ausente (109).

El músculo liso se caracteriza por carecer de unidades sarcoméricas del tipo encontrado en los músculos esqueléticos (15). Los filamentos están adheridos a los llamados cuerpos densos y a ciertas estructuras de la membrana o sarcolema.

Durante la actividad de los músculos estriados, los filamentos de actina se desplazan desde cada extremo del sarcómero hacia el centro, entre los filamentos de miosina (189). La repetición de muchos de estos movimientos microscópicos conduce a una contracción macroscópica de la fibra. Estos eventos moleculares son aplicables también al músculo liso (234) (Fig. 1)

El suplemento energético para el desplazamiento de los filamentos proviene de la hidrólisis del ATP por la actividad ATPásica característica de la miosina (225) (109).

En todas las células musculares la contracción es iniciada por un incremento en la concentración citosólica de Ca^{2+} libre, pero el mecanismo de activación por el Ca^{2+} varía de acuerdo

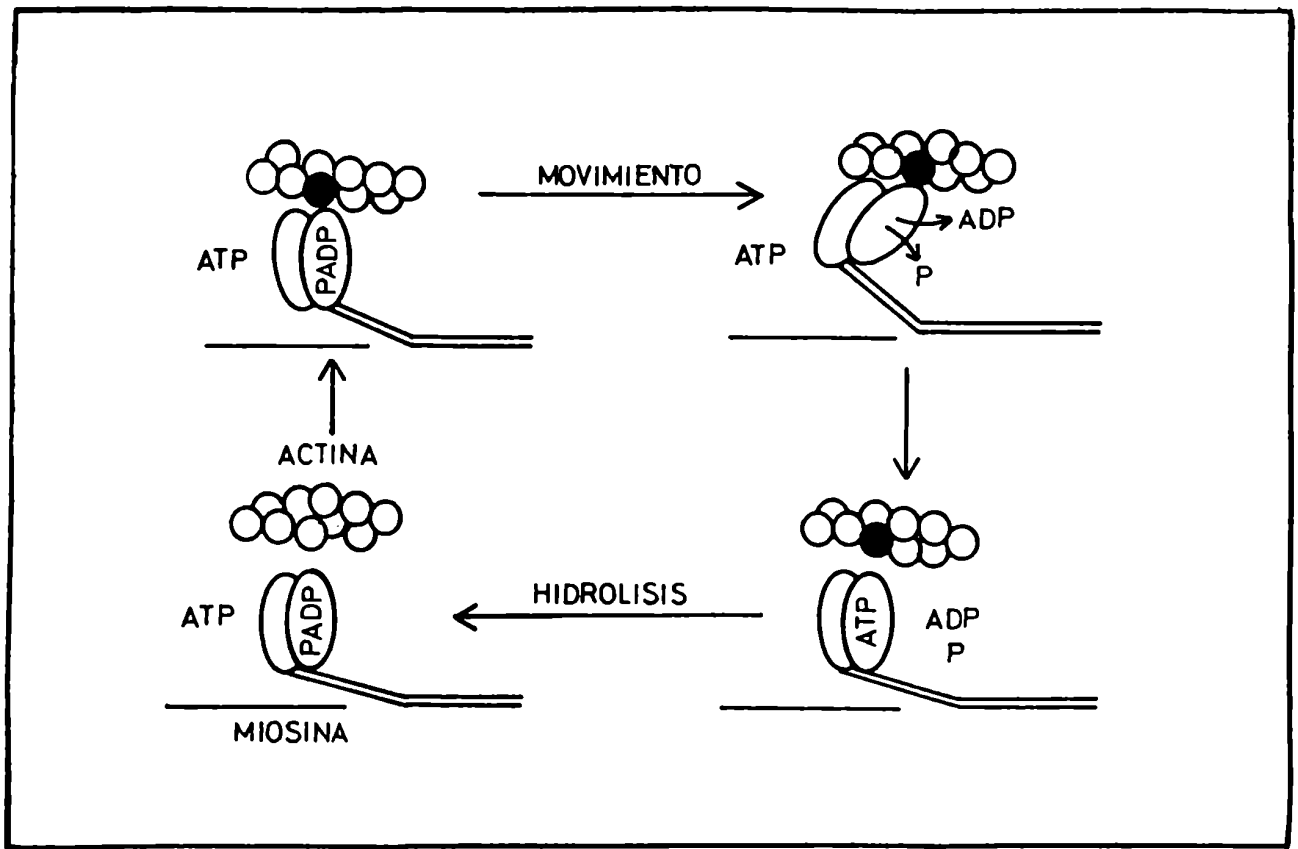


Fig. 1: Esquema del desplazamiento de los filamentos acoplado a la hidrólisis del ATP durante la contracción muscular

con el tipo muscular (4).

Se ha encontrado en los músculos no sarcoméricos (225) que una proteína quinasa específica fosforila la cadena liviana de la miosina. Esta proteína quinasa (miosina quinasa) es activada por otra proteína llamada calmodulina (homóloga a la subunidad C de la troponina) unida al Ca^{2+} cuando los niveles en citosol son elevados (110) (90). Una vez fosforilada la miosina, se incrementa la afinidad de ella por la de actina y sobreviene la contracción (Fig. 2)

La relajación se produce cuando disminuye la concentración de Ca^{2+} libre y como consecuencia la calmodulina queda libre de Ca^{2+} y se disocia del componente catalítico de la quinasa descripta, lo que ocasiona su desactivación.

Existen procesos capaces de modular este mecanismo de contracción-relajación, vía Ca^{2+} - calmodulina, que implican fosforilaciones proteicas reversibles mediadas por estimulación de beta adrenorreceptores (228).

1.2.3 Influencia hormonal

La mayoría de los músculos lisos tienen una función específica que es llevada a cabo intermitente o continuamente a través de la vida. La función del útero sin embargo, varía de acuerdo con el estado reproductivo del animal. Sufre cambios cíclicos en preparación para una posible implantación del blas-

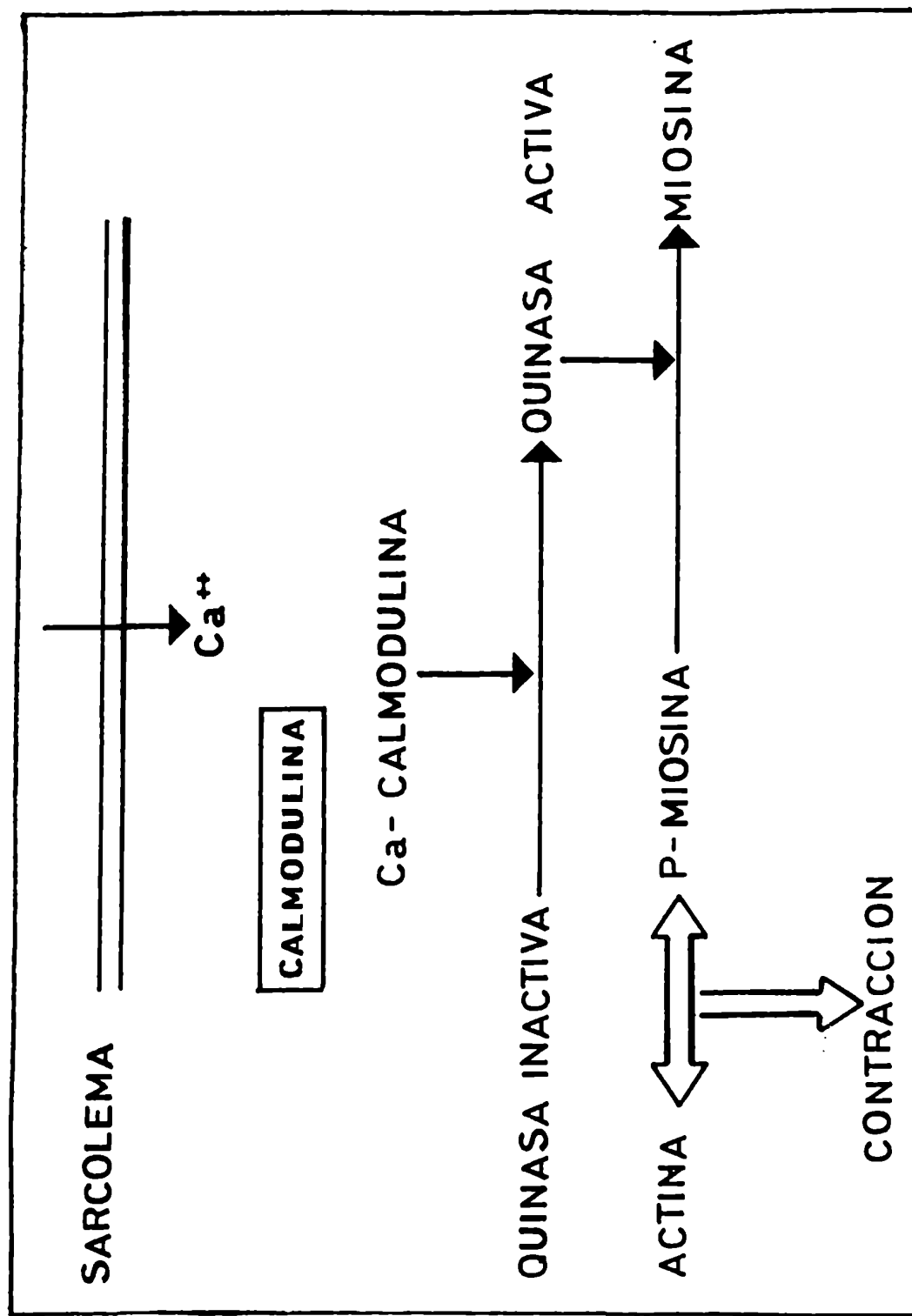


Fig 2: Aspectos moleculares de la contracción del músculo liso

tocisto y si esto ocurre, crece con el embrión en desarrollo y durante el parto varía desde una relativa quiescencia a una extrema actividad contráctil (55).

El estado hormonal ejerce una notable influencia sobre el miometrio y parecen operar en él numerosas modificaciones: morfológicas, eléctricas, contráctiles, que se repetirán cíclicamente a través de los ciclos sexuales (214).

Los esteroides sexuales que circulan en plasma, luego de secretados por el ovario, varían marcadamente a lo largo del ciclo estral.

Las mediciones de los mismos fueron realizadas durante el ciclo estral de la rata por Neill y Smith (194) (Fig. 3). Sus estudios muestran que los niveles plasmáticos de estradiol comienzan a elevarse progresivamente a partir de las 17 hs del diestro y llegan a un máximo a la mañana del proestro, luego del cual descienden para alcanzar los niveles basales en el estro después de la ovulación.

En cuanto a la progesterona se observa que sus niveles aumentan rápidamente a partir de las 13 hs del proestro hasta alcanzar el máximo a las 17 hs del mismo estadio, luego de lo cual sus niveles plasmáticos descienden para retornar a basales en la mañana del estro.

Durante el metaestro, el cuerpo lúteo funcionante, aunque

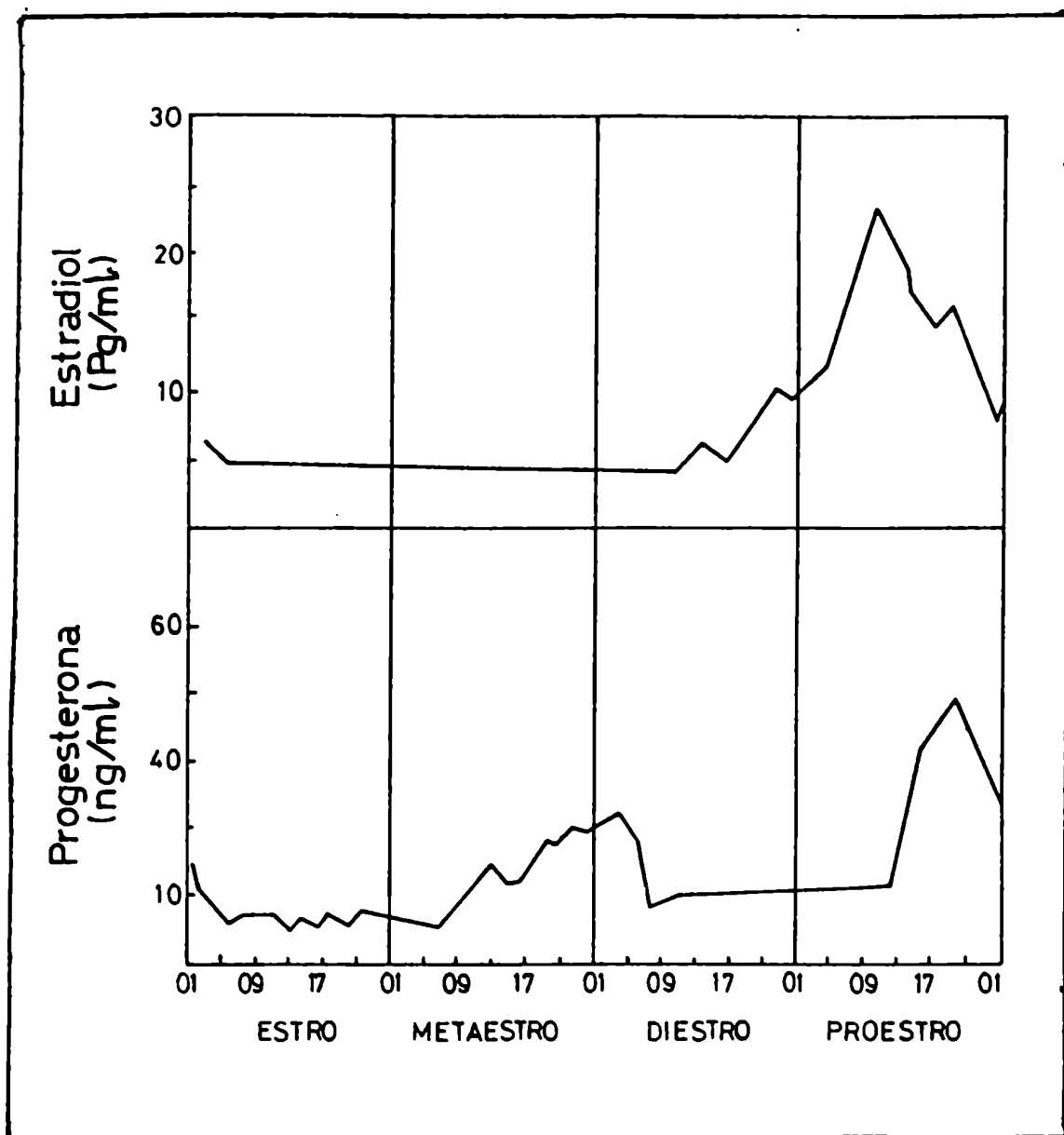


Fig. 3: Niveles plasmáticos de estradiol y progesterona a través del ciclo sexual de la rata.

de vida fugaz en la rata, secreta progesterona, por lo tanto, durante éste período los niveles plasmáticos de la hormona también están algo elevados.

En las ratas inmaduras no se han desarrollado todos los pasos de los mecanismos implicados en las acciones de las hormonas sexuales en general y en el miometrio en particular (249). El estado adulto y la pubertad son el resultado de un proceso de desarrollo gradual, armónico y sincronizado (201).

Se han propuesto para la rata las siguientes fases de desarrollo hasta alcanzar la madurez sexual (201)

- período neonatal (días 1 a 7 después del nacimiento)
- período infantil (días 7 a 21)
- período juvenil o prepuberal (días 21 a 32)

Aproximadamente en el día 32 aparece por primera vez el fluido uterino, precediendo a la primera ovulación.

Durante estas fases se registraron variaciones en los niveles plasmáticos de hormonas sexuales (201)(175)(174)(63).

Los niveles estrogénicos se hallan elevados durante el período infantil, y los mismos parecen provenir en su mayoría de las glándulas adrenales, más que de los ovarios (187). Luego de la fase infantil los niveles en plasma de estas hormonas decrecen claramente y permanecen bajos durante todo el período prepuberal.

El ovario de la rata infantil también produce progesterona, aunque la mayor parte del esteroide circulante proviene de las glándulas adrenales (187). A partir de la fase prepuberal la progesterona sérica comienza a elevarse gradualmente.

Muchas de las acciones de las hormonas esteroideas parecen ser dependientes de la unión de las mismas a un receptor proteico. Hay evidencias de que diversas respuestas están mediadas por un sistema de receptores citosólico-nucleares (11)(134)(88).

El útero de rata neonatal presenta receptores para estrógenos citoplasmáticos que se incrementan en número hasta un máximo en el día 10 de vida, para luego declinar y alcanzar un nivel estable a partir del día 30 (51) (158). Sin embargo, el estudio de los receptores nucleares, reveló que se hallan en menor proporción a los 7 días de vida que a los 20 (166). Tchernitchin (249) apunta que en las ratas inmaduras la transferencia del receptor citosólico al núcleo está disminuida y considera que la maduración insuficiente de este mecanismo es la causa de la disociación temporal entre las respuestas genómicas de los estrógenos (síntesis de RNA y proteínas que aparecen a los 10 días de vida) y algunos otros parámetros de la estimulación estrogénica como la eosinofilia y edema uterino, que se desencadenan luego del día 15.

En ratas inmaduras Hsue encontró que la progesterona es capaz de disminuir los receptores para estrógenos (124).

Los estrógenos promueven respuestas uterotróficas denominadas tempranas y tardías (140). Son reconocidas como respuestas tempranas: la inducción de una proteína denominada inductora (140), el aumento de oxidación de glucosa (263), el incremento de la actividad de la RNA polimerasa II (107), la síntesis de RNA y proteínas y el aumento del contenido de agua uterino. Estas respuestas se detectan luego de 6 hs de una inyección de estradiol a ratas adultas (140).

Aproximadamente 20 hs después de un tratamiento estrogénico se manifiestan las respuestas llamadas tardías: síntesis de DNA e incremento del peso uterino (152).

La administración simultánea de progesterona y estrógenos puede provocar un crecimiento uterino menor que el desarrollado con estradiol solamente; probablemente el conocido efecto del progestágeno de disminuir los receptores estrogénicos, conduciría a una repoblación menor de receptores para estrógenos citoplasmáticos (125)(31).

Las respuestas morfológicas a la progesterona son disímiles en diferentes tejidos, aunque en todos ellos es capaz de disminuir los receptores estrogénicos (40). En gatos y monos la progesterona hipertrofia y aumenta la secreción del endometrio, atrofia el oviducto y produce pérdida de cilias y desdiferenciación (140). Willams y Rogers (270), hallaron un incremento en la longitud de las células epiteliales uterinas de ratas, 2 hs después de la administración de progesterona; cosa que estuvo precedida por un aumento significativo del tamaño nuclear y del

volumen de la fracción citoplasmática de ribosomas libres y de retículo endoplasmático rugoso. A diferencia de los mecanismos que operan las respuestas al estradiol, no parece implicar una síntesis de RNA dirigida por DNA (270).

Los estrógenos además de promover los bien conocidos efectos del crecimiento uterino, que parecen estar mediados por receptores estrogénicos intracelulares, ejercen una profunda influencia sobre la motilidad uterina (56).

La influencia de los estrógenos sobre el músculo liso uterino, particularmente las vinculadas con la actividad contráctil espontánea, son probablemente independientes de aquellas mediadas por un receptor estrogénico clásico y parecen ser el resultado de la influencia de los esteroides sobre la permeabilidad de la membrana a iones tales como el Ca^{2+} (18).

Reynolds había observado que el útero de varias especies carecía de actividad espontánea luego de la castración (215).

Harper (108), indicó que el útero de rata ovariectomizada se caracterizaba por poseer contracciones irregulares y de baja amplitud, y los estrógenos fueron considerados como activadores de la motilidad uterina (207)(214). Sin embargo trabajos posteriores han documentado que el miometrio aislado de rata ovariectomizada exhibe una definida actividad espontánea y contracciones más regulares que las preparaciones de animales en estro. En este sentido, Bydeman (46) demostró que el 17-beta estradiol era inhibitorio de las contracciones espontáneas del músculo uterino. Mossman y Conrad (188), han comunicado que

esa hormona era capaz de inhibir también las contracciones de preparaciones uterinas humanas durante la gestación.

Gimeno y col. (85), observaron que el útero aislado de ratas multíparas castradas presentaba una clara actividad contráctil espontánea. La estabilidad en el tiempo de la tensión contráctil y la frecuencia de las contracciones era mayor en dichas preparaciones que en las obtenidas de ratas en estro natural (estado caracterizado hormonalmente por presentar una gran influencia estrogénica). Al analizar el efecto de los estrógenos sobre la actividad espontánea del útero aislado de rata ovariectomizadas (163), se halló que el tratamiento con 17-beta estradiol inhibía dicha actividad.

2. Unión neuroefectora adrenérgica

2.1 Generalidades

Las uniones neuromusculares autonómicas difieren en muchos aspectos de las uniones neuromusculares esqueléticas, ya que el efector es una agrupación de células musculares y no una célula individual. Existe un acoplamiento electrotónico entre las células, representado morfológicamente por áreas de estrecha aposición entre las membranas de células adyacentes (95). Micrografías de alta resolución muestran que en esos sitios las membranas poseen uniones en hendiduras (79).

En la vecindad del tejido efector, los axones de las fibras simpáticas postsinápticas se vuelven varicosos y ramificados. El grado de ramificación, el área de tejido efector afectado por neuronas adrenérgicas individuales y el ancho del espacio neuromuscular, varían con cada tipo de tejido. La densidad de la innervación adrenérgica, en términos del número de perfiles axónicos por cada cien células musculares en sección transversal, también difiere considerablemente en diferentes órganos. Es muy alta en conducto deferente, iris y membrana nictitante y menor en el útero y el uréter (44).

La norepinefrina ó noradrenalina es el neurotransmisor de la mayoría de las fibras simpáticas postsinápticas y de ciertos tractos del sistema nervioso central.

Su vía biosintética está representada en la figura 4. La síntesis de las enzimas que sintetizan norepinefrina ocurre en los cuerpos neuronales de las neuronas adrenérgicas y migran posteriormente por transporte axoplasmático hacia los terminales neurales (143).

La tirosina es el primer sustrato implicado en la biosíntesis. Las transformaciones a partir de éste aminoácido que conducen a la formación de dopamina están mediadas por enzimas presentes extragranularmente en el citoplasma (44). La dopamina sintetizada se convierte a su vez en norepinefrina dentro de las vesículas de los terminales noradrenérgicos por la acción catalítica de la dopamina beta hidroxilasa asociada a dichos gránulos.

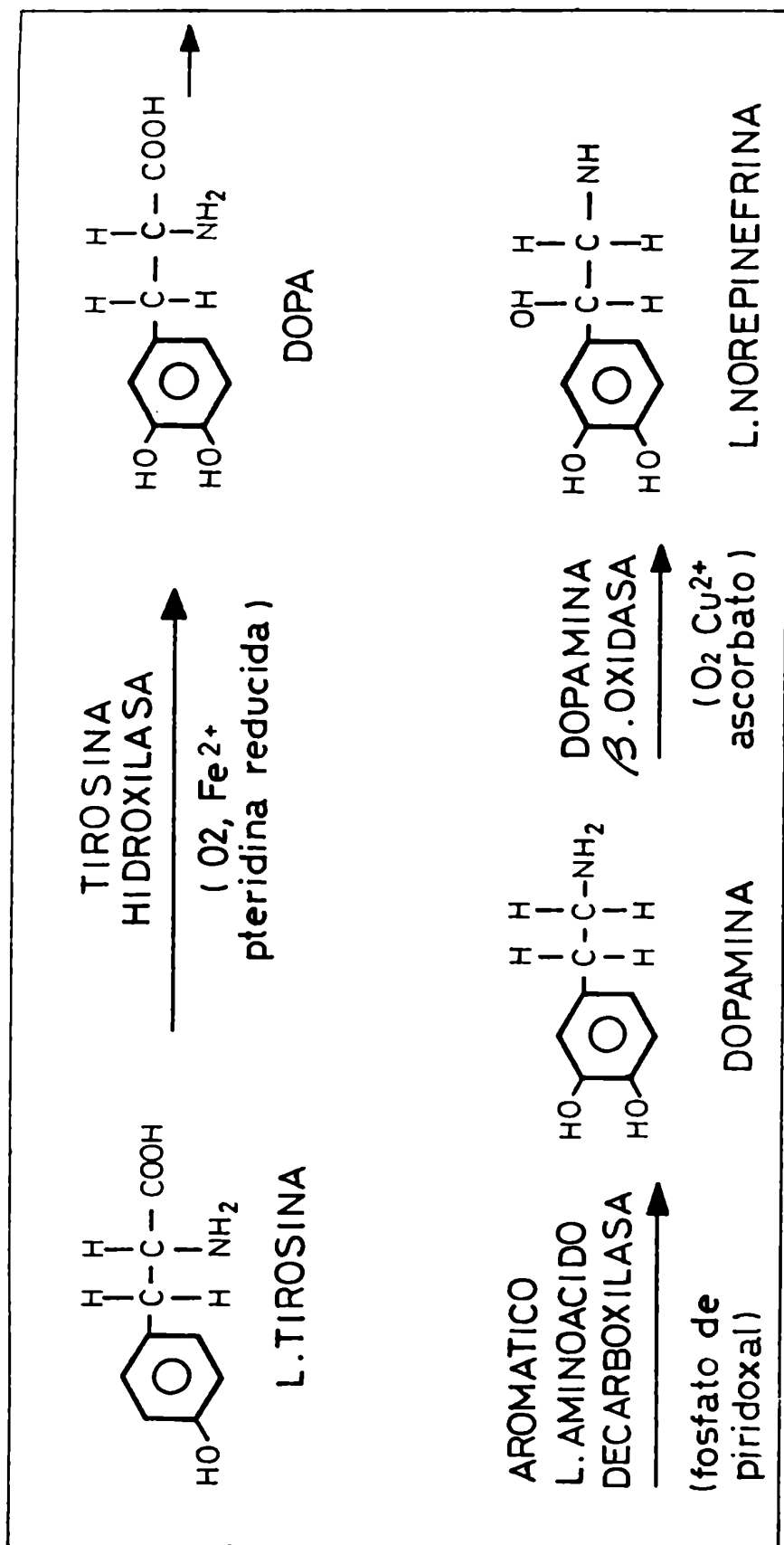


Fig. 4: Vía biosintética de la Norepinefrina

los (244). Al mismo tiempo, los gránulos son capaces de concentrar norepinefrina proveniente del citoplasma por medio de un sistema de transporte que requiere ATP y iones Mg^{2+} (49). En el gránulo, la norepinefrina libre está en equilibrio con el complejo catecolamina-ATP-proteína (cromograninas).

Por microscopía electrónica Bengtsson demostró que existirían 2 tipos de vesículas capaces de almacenar y acumular norepinefrina, las que se corresponden probablemente con las vesículas de cuerpo denso grandes y pequeñas.

La llegada de un impulso nervioso provoca la liberación de norepinefrina de las fibras adrenérgicas. Los iones Ca^{2+} parecen desempeñar un papel fundamental en el acople del impulso nervioso y la liberación de norepinefrina de los terminales adrenérgicos por el proceso de exocitosis (64)(275). Este fenómeno se denomina liberación por estímulo nervioso, pero existe además liberación sin despolarización, lo cual se conoce como liberación espontánea (45).

La liberación espontánea proporciona una reducida cantidad de neurotransmisor que a diferencia de la liberación por estímulo nervioso, es insuficiente para desencadenar respuestas del efector. En la placa mioneural, la liberación espontánea queda demostrada por el registro de los potenciales en miniatura, pero en los efectores autonómicos este tipo de registro se ve dificultado porque una célula efectora puede presentar varias uniones neuroefectoras.

El metabolismo de la norepinefrina (Fig. 5) es llevado a cabo principalmente por dos enzimas: monoamino oxidasa (MAO) (227) y catecol-o-metiltransferasa (COMT) (274), que están presentes en la unión neuroefectora adrenérgica, en los ganglios simpáticos y en varias áreas del sistema nervioso central.

La MAO se ubica tanto en los terminales nerviosos adrenérgicos, como así también extraneuronamente (236)(70).

La actividad enzimática de COMT parece hallarse fundamentalmente en el tejido extraneuronal (17).

La Fig. 6 esquematiza los diversos caminos a seguir por la norepinefrina, una vez que esta ha sido liberada por las variaciones axonales adrenérgicas.

1- Interacción con sus receptores específicos postsinápticos

Ahlquist (8) propuso los términos de alfa ó beta receptor para designar los sitios en el órgano blanco donde las catecolaminas producían respuestas excitatorias o inhibitorias respectivamente.

La clasificación de los receptores alfa en alfa 1 ó 2 es meramente operacional; está basada en la afinidad relativa para los agonistas y antagonistas y es independiente de la localización pre o postsináptica (30) (19).

Por otro lado, Lands y col (153) postularon la existencia de dos tipos de adrenorreceptores beta, fundamentando tal división en la observación de diferencias de potencia de una se-

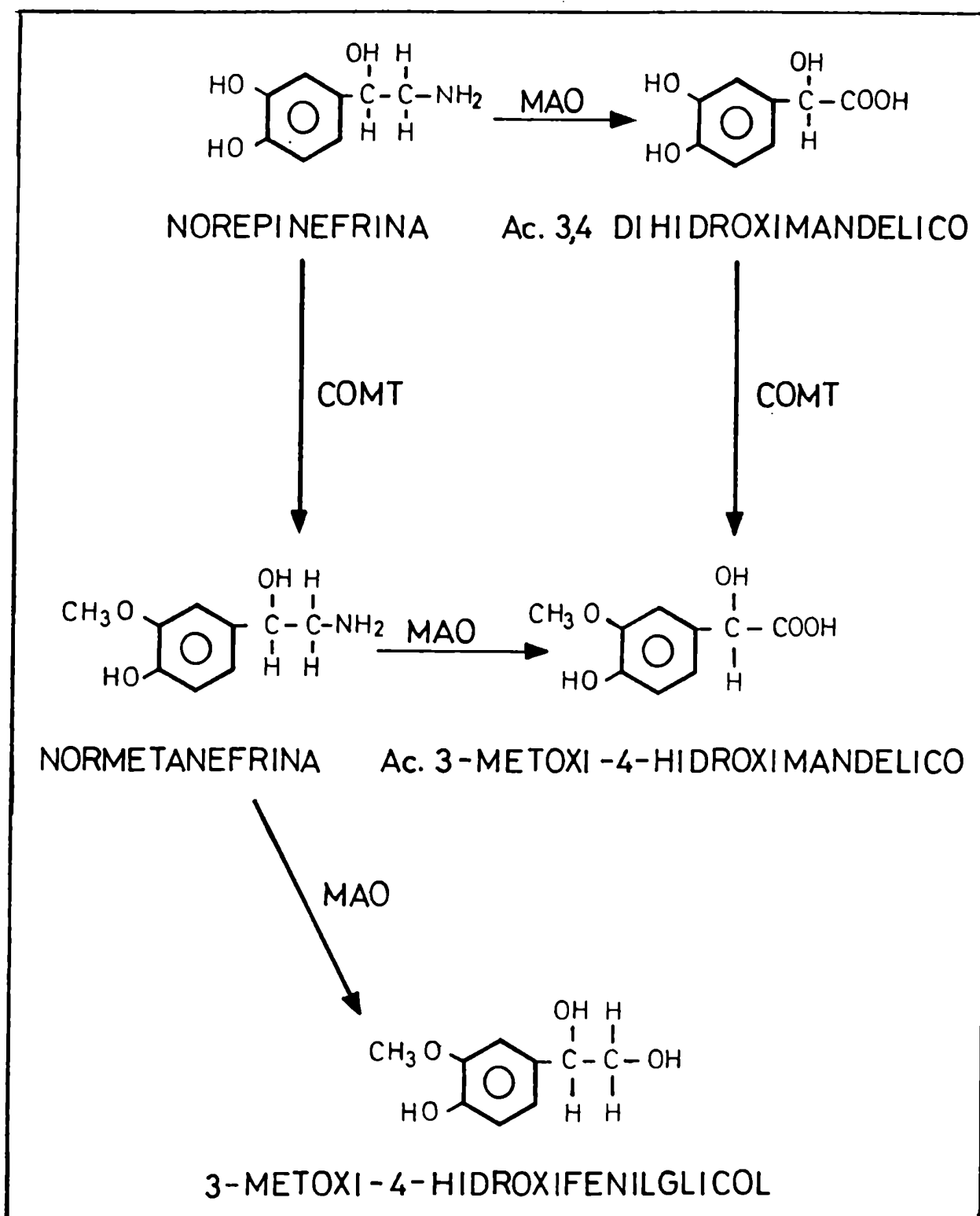


Fig. 5: Vías metabólicas de la Norepinefrina

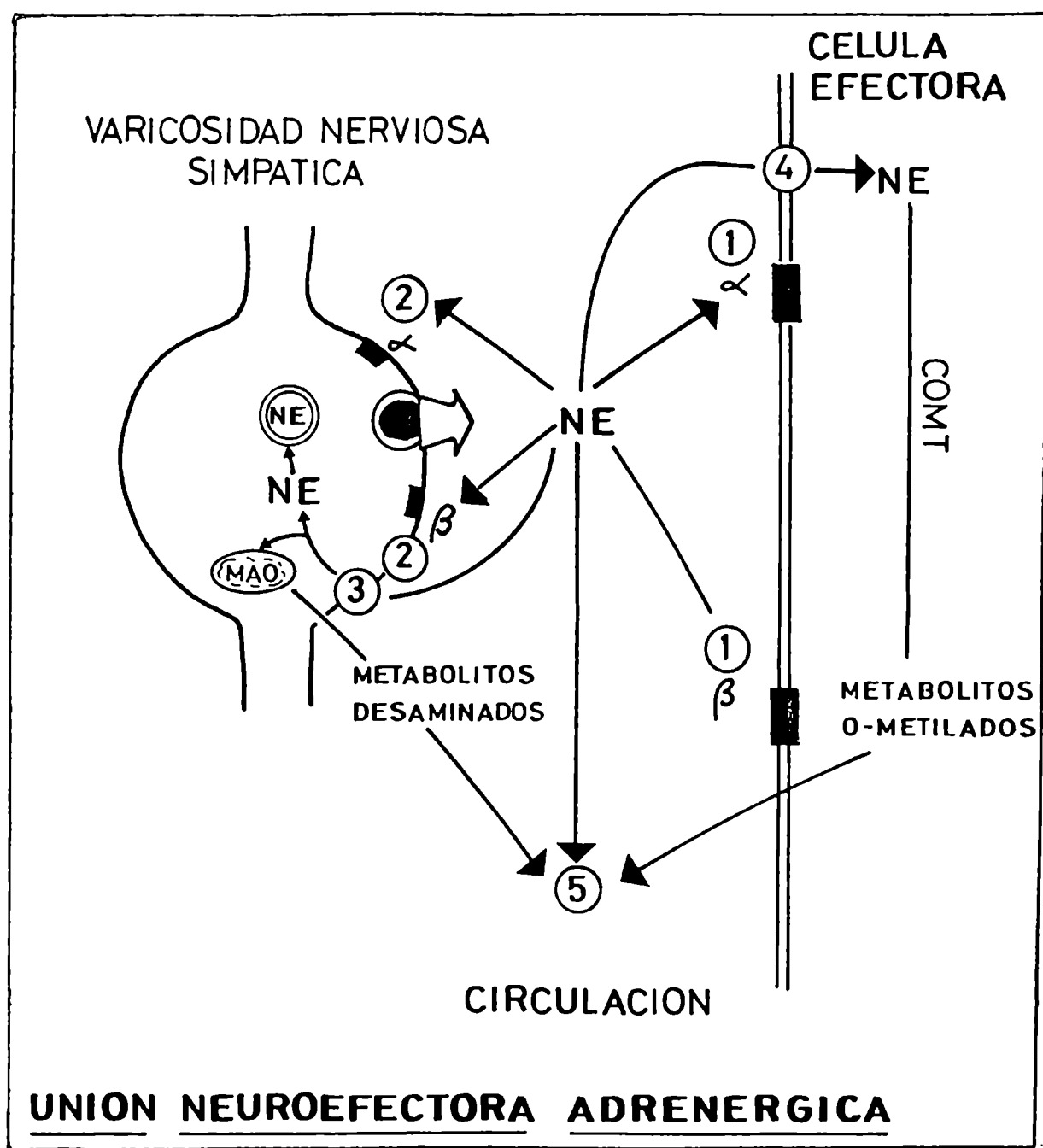


Fig. 6: Esquema de los caminos a seguir por la norepinefrina liberada por el terminal noradrenérgico

1. Interacción con receptores postsinápticos
2. Interacción con receptores presinápticos
3. Recaptación neuronal
4. Recaptación extraneuronal
5. Pasaje a circulación

rie de catecolaminas para producir distintas respuestas tipo beta. Es así que clasificaron a los receptores en beta 1 y beta 2. La estimulación de los beta 1 provocaba incremento de cuatro propiedades cardíacas (cronotropismo, inotropismo, dromotropismo, batmotropismo), lipólisis e inhibición de la motilidad intestinal. Por su parte la estimulación de los beta 2 provocaba vasodilatación, broncodilatación, inhibición de la motilidad uterina y glucogenólisis muscular.

Además de estos procedimientos farmacológicos para la clasificación y caracterización de adrenorreceptores, basados en la potencia de los agonistas para evocar respuestas fisiológicas ó bien en la potencia de los antagonistas para bloquear esas respuestas, se han desarrollado ensayos bioquímicos directos (178)

La tecnica básica que implica la unión reversible y competitiva de un radioligando, generalmente un antagonista, a moléculas adrenorreceptoras, permite obtener los parámetros que caracterizan un receptor: afinidad y capacidad o número de sitios receptores (120)

Recientemente se han aislado entidades concretas de alta afinidad para agonistas de adrenorreceptores.

Shorr y col. aislaron y purificaron el adrenorreceptor beta de eritrocitos de rana con un elevado grado de homogeneidad. Se determinó que su constitución química es glicoproteica y consiste de subunidades de 58.000 daltons (231). La proteína purificada de membrana de eritrocito de rana contendría al sitio adrenorreceptor beta ya que une con alto grado de especificidad a radioligandos beta (231).

Guellaen y col. (94) han solubilizado el adrenorreceptor alfa 1 y determinaron para el mismo un PM de 96.000 daltons.

Wood y col. (273) demostraron que en el pasaje de extractos solubles sobre columnas de agarosa-alprenolol se adsorbían los adrenorreceptores beta, pero no los alfa, indicando que ambos sitios aceptores no residirían en la misma molécula.

Los adrenorreceptores adrenérgicos reconocen y se unen reversiblemente a los agonistas adrenérgicos. Como resultado de la interacción, se desencadenan cambios celulares que difieren según el subtipo de receptor implicado y que sirven de señal intracelular entre la unión del neurotransmisor al receptor y la respuesta celular (Fig. 7)

En la estimulación de adrenorreceptores alfa 1, la señal

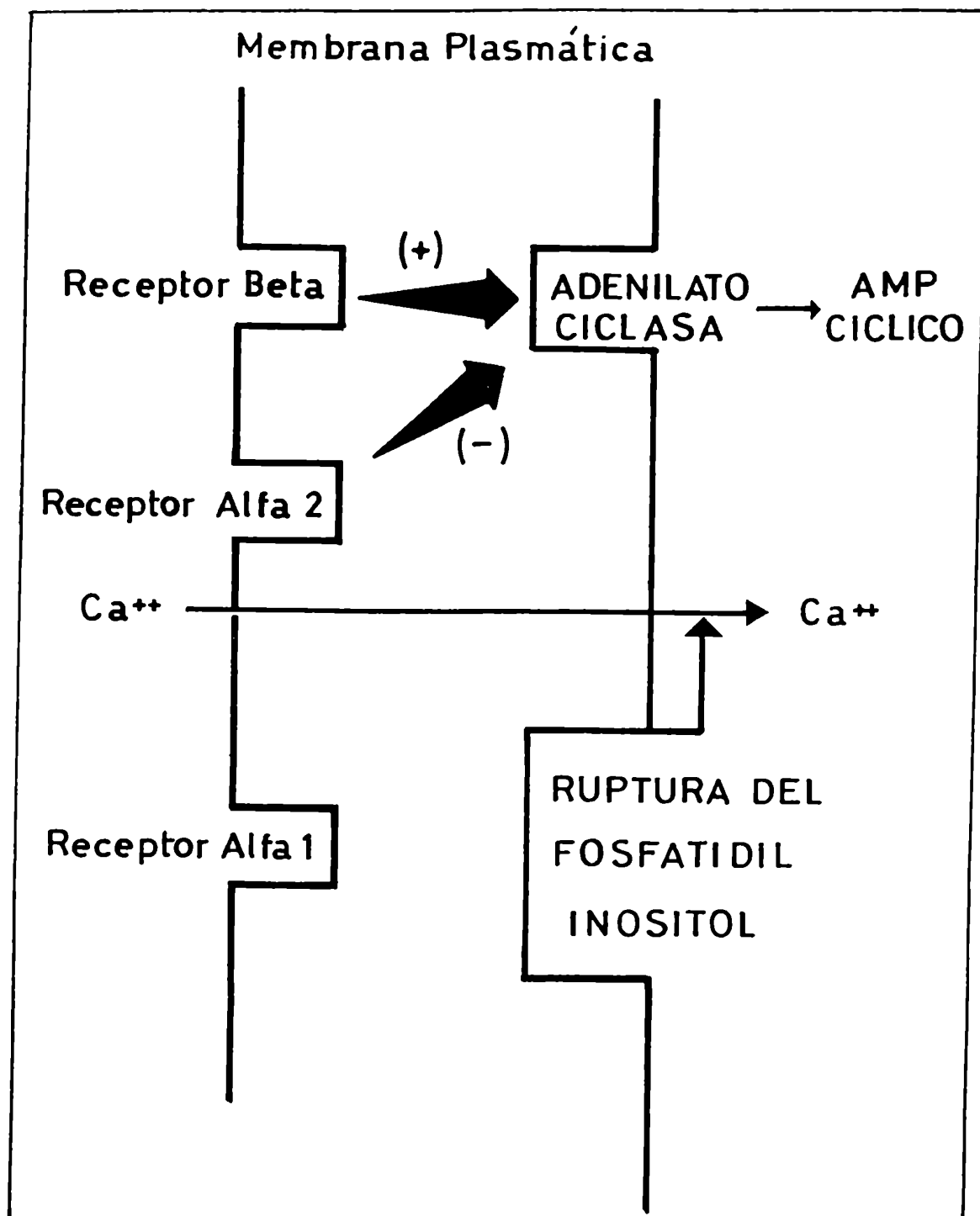


Fig. 7: Señales intracelulares generadas por activación de adrenorreceptores

principal es un incremento de la concentración de Ca^{2+} en el citosol como resultado de la movilización del mismo desde sitios intracelulares o extracelulares (29).

Michell (176) propuso que la degradación o ruptura del fosfatidil inositol (fosfolípido ácido de la membrana celular) inducida por estimulación de adrenorreceptores alfa 1 sería un mecanismo primario responsable de la movilización del Ca^{2+} . Se han hallado evidencias en contra de esta propuesta ya que la ruptura del fosfatidil inositol parece ser en algunos casos paralela a la movilización tisular de Ca^{2+} y más aún, en algunos tejidos es dependiente de ese ión (133) (52).

Las señales intracelulares generadas en la activación de los adrenorreceptores alfa 2 postsinápticos son menos conocidas y sólo ha sido detectado una inhibición de la enzima adenilato ciclasa (132) (131).

La mayoría de las acciones de las catecolaminas mediadas por activación de adrenorreceptores beta parecen requerir la participación de la adenilato ciclasa con el consecuente incremento de las concentraciones intracelulares de AMP cíclico (248). La formación de AMP cíclico está precedida por una secuencia de etapas (160) (Fig. 8)

- 1- El agonista se une al adrenorreceptor beta y forma un complejo binario hormona receptor
- 2- Un cambio conformacional del receptor inducido por el agonista lleva a una interacción del complejo con la proteína regu-

ladora, la que a su vez está formando complejo con GDP

- 3- Este complejo ternario pierde GDP y adquiere GTP
- 4- La proteína regulatoria adherida al GTP se separa del complejo hormona-receptor y se combina con la subunidad catalítica de la enzima para convertir el ATP en AMP cíclico.

Muchas evidencias indican que las acciones mediadas por adrenorreceptores beta implican fosforilaciones proteicas catalizadas por proteínas quinasas. Estas fosforilaciones son consecuencia del incremento de AMP cíclico inducido por estimulación de adrenorreceptores beta de la adenilato ciclasa. Este nucleótido cíclico activa proteínas quinasas dependientes de AMP cíclico, las cuales fosforilando proteínas específicas alteran funciones celulares tales como: glicogenólisis, lipólisis transporte iónico etc. (161) (239).

II- Interacción con sus receptores específicos presinápticos

Además de los clásicos adrenorreceptores postsinápticos que median las respuestas del órgano efector, existen también receptores localizados en los terminales nerviosos noradrenérgicos. Estos receptores presinápticos están implicados en la modulación de la liberación de norepinefrina inducida por potenciales de acción evocados tanto en sistema nervioso central como en el periférico (156).

Se ha determinado que los adrenoceptores alfa presinápticos que modulan la liberación de norepinefrina tanto en estructu-

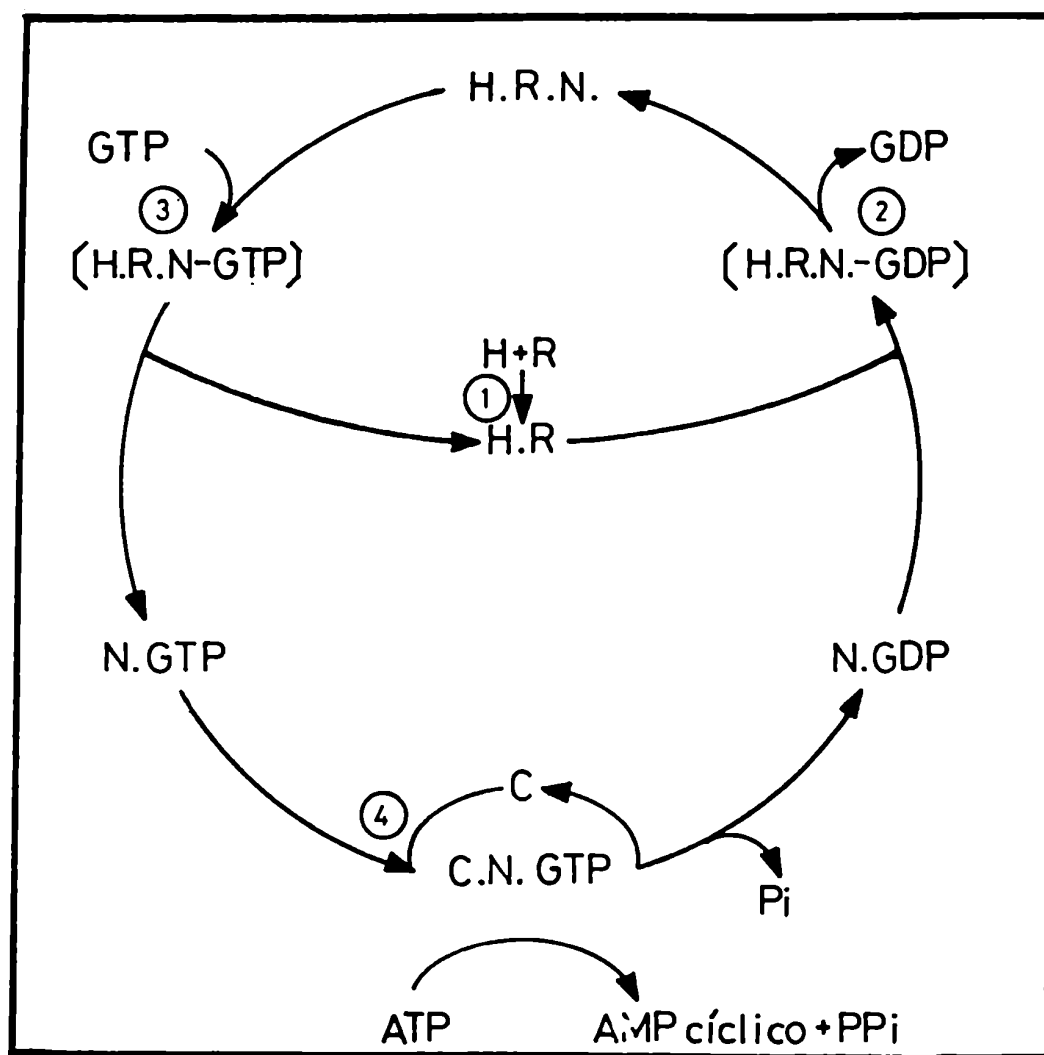


Fig. 8: Modelo de la activación de la Adenilato Ciclasa mediada por adrenorreceptor beta

H= hormona

R= receptor

N= proteína reguladora que une nucleótidos de guanina

C= subunidad catalítica de la Adenilato Ciclasa

ras periféricas como centrales, son del tipo alfa 2 (245). Siendo inhibitorios de la liberación de norepinefrina a través de un mecanismo de retroalimentación negativa mediada por el propio neurotransmisor (58).

El fenómeno opuesto, ó sea una facilitación de la liberación de neurotransmisor, se desencadena con la participación de adrenorreceptores beta presinápticos (6) (59).

III- Recaptación neuronal

Con técnicas histoquímicas de fluorescencia fue posible demostrar (105) en el iris de rata previamente deplecionado de norepinefrina por reserpinización, que luego de una inyección de norepinefrina, la misma se acumulaba en fibras adrenérgicas, incluyendo tanto a los cuerpos celulares como a los terminales axónicos. Observaciones similares fueron hechas por Gillespie y col. (84) combinando las técnicas de fluorescencia con radioautografía.

Whitby y col. (266) observaron que la norepinefrina radiactiva circulante era retenida principalmente en tejidos con rica inervación simpática. Los autores mostraron además que la habilidad para acumular catecolamina exógena era reducida luego de la denervación simpática (266)

La recaptación neuronal parece ser el resultado de la actividad de un sistema transportador de membrana dependiente de energía metabólica (262) ya que se observó una facilitación de

la recaptación neuronal por ATP y una dependencia funcional con la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa.

El proceso de recaptación es saturable, dependiente de la temperatura y posee una alta afinidad para la norepinefrina, cuya constante de transporte o K_m aparente es de 0.2-1 μM en la mayoría de los tejidos de rata estudiados (129).

Esta transferencia de la catecolamina desde su sitio extracelular hacia el terminal nervioso es responsable de la terminación de las acciones de la catecolamina liberada (129).

Drogas tales como la cocaína y la desipramina (conocidas como inhibidores de la recaptación neuronal) potencian y prolongan las repuestas de los órganos inervados por el simpático ante una estimulación nerviosa (fenómeno denominado supersensibilidad) (155)(127).

IV- Recaptación extraneuronal

La primera descripción de la recaptación extraneuronal fue hecha por Iversen (128), quien observó que difería de la recaptación neuronal por carecer de estereoselectividad, no ser inhibible por cocaína y de utilizar como sustratos todas las catecolaminas incluyendo al isoproterenol.

La recaptación está asociada a células del músculo vascular (115) (204) (114), células cardíacas (130) (71) (35), células glandulares (106) (10), etc.

La catecolamina que ha sido recaptada se metabolizaría por vía de la catecol-o-metiltransferasa y/o la monoaminaoxidasa. En aorta de conejo se observó (67) que ambas enzimas implicadas en la formación extraneuronal de metabolitos operan en serie. En el tejido extraneuronal del corazón de gato, la norepinefrina es exclusivamente o-metilada por la catecol-o-metiltransferasa mientras que la o-metilación y la deaminación tienen igual importancia en otros tejidos (71) (116) (204).

La normetanefrina, metanefrina y corticosterona, son potentes inhibidores de la recaptación extraneuronal (129).

V- Pasaje a circulación

En el caso de los terminales periféricos o en zonas fuera de la barrera hematoencefálica, la norepinefrina puede pasar a la circulación.

2.2 Participación de las prostaglandinas en la neurotransmisión adrenérgica

La neurotransmisión adrenérgica es un fenómeno complejo que implica numerosas interacciones biofísicas y bioquímicas en la cual existen múltiples factores reguladores. Westfall (265) postula varios mecanismos de regulación local de la liberación de norepinefrina por los terminales adrenérgicos (Fig. 9) :

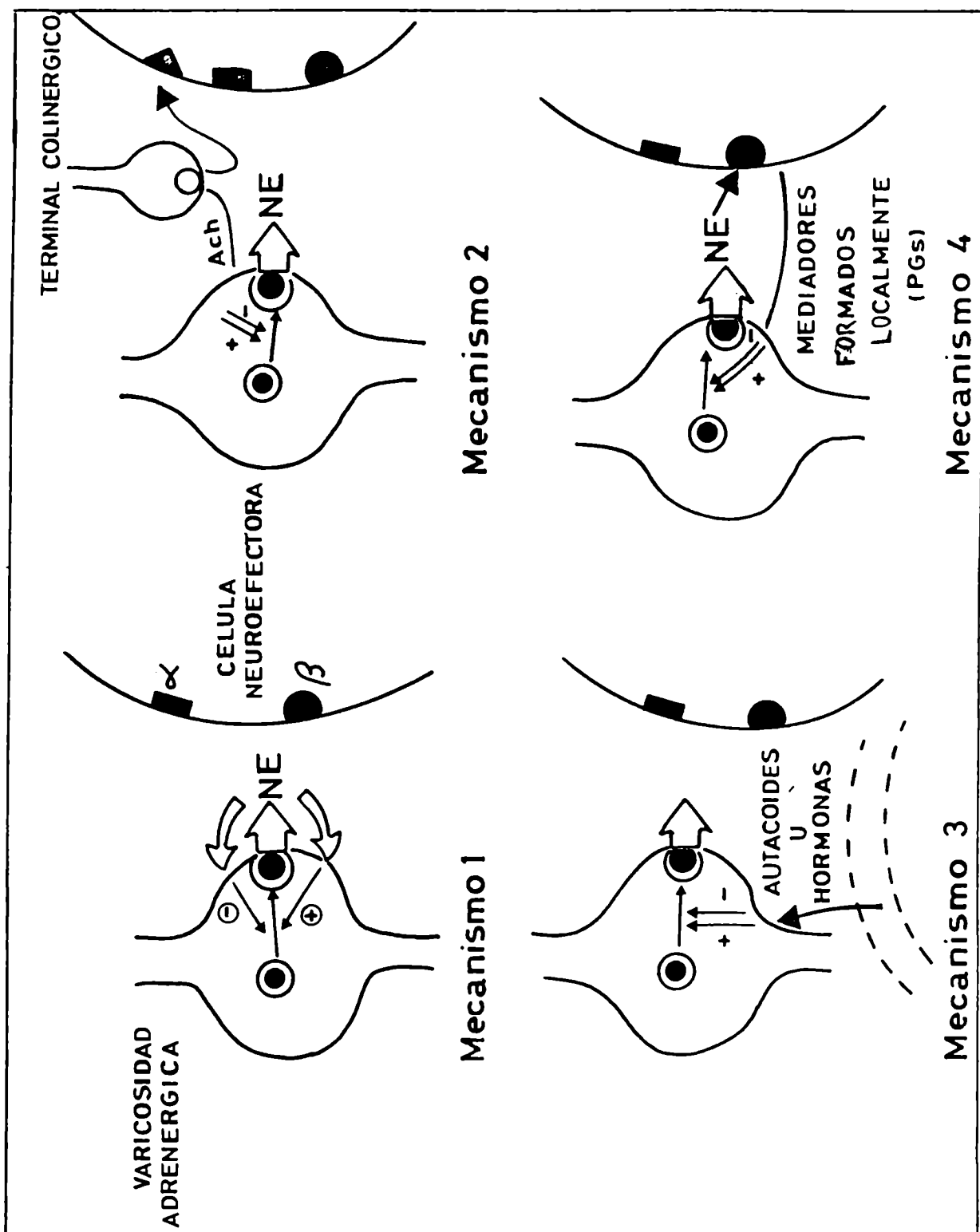


Fig. 9: Esquema de posibles mecanismos implicados en la modulación local de la neurotransmisión adrenergica

- 1- Interacción del neurotransmisor sobre sus correspondientes adrenorreceptores alfa o beta presinápticos, con lo cual se inhibe o facilita respectivamente la liberación de la catecolamina por impulso nervioso.
- 2- Modulación por sustancias tales como acetilcolina, liberadas a partir de neuronas que terminan próximas a las varicosidades adrenérgicas.
- 3- Acción de mediadores formados localmente o provenientes de la circulación.
- 4- Participación de sustancias originadas localmente como por ejemplo, las prostaglandinas, luego de la activación de los receptores postsinápticos en la célula efectora. Este último mecanismo sería una regulación de tipo transináptica por retroalimentación negativa.

Muchas observaciones sugieren que las prostaglandinas (PGs) son importantes moduladores transinápticos de la neurotransmisión autonómica adrenérgica. En los primeros estudios al respecto (111) (113) (181), se observó que la PGE reducía el eflujo de norepinefrina de tejidos estimulados eléctricamente. Esto se interpretó en una primera instancia, como un efecto estimulatorio de la PGE sobre la degradación metabólica del neurotransmisor. Sin embargo, estudios posteriores realizados en corazón de cobayo, no demostraron alteración en las actividades

metabólicas de la MAO ni de la COMT por tratamiento con PGE (264). Además, la PGE no ejerce interferencias sobre la propagación del impulso nervioso (112) (242).

Se han investigado, sin resultados positivos, otros mecanismos de acción probables para explicar la influencia inhibitoria de las PGs en la liberación del neurotransmisor inducida por estímulo eléctrico. Sin embargo, se ha hallado una estrecha vinculación con la disponibilidad de Ca^{2+} , necesario para la liberación del neurotransmisor por impulso nervioso (112), aunque se desconoce de qué manera la PG influye sobre el Ca^{2+} ambiental.

El sitio de síntesis de las PGs endógenas que participarían en esta regulación local no está bien establecido. Podrían ser liberadas por los terminales adrenérgicos como resultado de la liberación del neurotransmisor. En este caso, la norepinefrina actuaría sobre la presinapsis liberando a las PGs o bien la liberación sería simultánea con la de la amina. Existen evidencias que avalan esta hipótesis; por ejemplo en el corazón de conejo (136) la liberación de PGs inducida por norepinefrina no es inhibida por bloqueantes de adrenorreceptores alfa o beta. Los inhibidores de la síntesis de PGs incrementan la liberación de norepinefrina inducida por estimulación nerviosa sin cambio visible de la respuesta contráctil en conducto deferente (241).

Otra alternativa es que la norepinefrina actúe sobre la célula efectora induciendo la producción de PGs como consecuen-

cia de la interacción del neurotransmisor con su receptor. Fortaleciendo este concepto se ha observado que el incremento de PGs por catecolaminas no es modificado por denervación química o quirúrgica (83). Los datos experimentales obtenidos hasta el presente avalean este último mecanismo.

La PGF, que también se libera a partir de tejidos con innervación adrenérgica, no parece ejercer retroalimentación negativa sobre la salida del neurotransmisor. Por el contrario se ha descrito un efecto facilitador de la liberación de norepinefrina. Así en el bazo del perro y en su arteria tibial, la PGF incrementa la respuesta a estimulación nerviosa sin afectar la respuesta a norepinefrina exógena (41).

2.3 Papel de las catecolaminas en la contracción y relajación del músculo liso

Los músculos lisos están usualmente innervados por ambas divisiones del sistema nervioso autónomo y la actividad nerviosa puede iniciar o modificar la contracción muscular a partir de la liberación de neurotransmisor de los terminales neurales.

Las acciones de las catecolaminas han sido descritas también por el análisis de la respuesta mecánica que inducen en diferentes músculos lisos (contracción o relajación) (42). Se ha progresado recientemente en el conocimiento de los proce-

los celulares que controlan el comportamiento contráctil del músculo liso y la influencia de las catecolaminas sobre los mismos (Fig. 10)

El Ca^{2+} desempeña un papel central en la regulación de la actividad muscular. Se reconoce al Ca^{2+} libre citosólico como mensajero responsable de la contracción muscular (226).

Los adrenorreceptores alfa 1 están directamente acoplados a los flujos de Ca^{2+} y su estimulación por agonistas catecolaminérgicos conduce a un incremento de la concentración de Ca^{2+} citosólico (226).

En músculo liso, el Ca^{2+} se uniría a una proteína llamada calmodulina y el complejo Ca-calmodulina activaría a una proteína quinasa (miosina-quinasa) encargada de fosforilar a la cadena liviana de la miosina, desencadenando la contracción (225). Además, la miosina-quinasa es capaz de sufrir una fosforilación reversible con lo cual deja de ser activada por el complejo Ca-calmodulina y sobreviene la relajación. Este proceso comienza por una estimulación de los adrenorreceptores beta que incrementa los niveles de AMP cíclico intracelular (228). El nucleótido activaría una proteína-quinasa dependiente de AMP cíclico, la cual fosforilaría a la miosina-quinasa. Así fosforilada, ésta es incapaz de ser activada por el complejo Ca-calmodulina. Tal secuencia de procesos celulares lleva a la relajación del músculo. La estimulación de adrenorreceptores beta promueve simultáneamente la relajación por otras fosforilaciones dependientes de AMP cíclico que aumentan el trans-

porte Na^+/K^+ acoplado al intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ que conduce a una reducción del Ca^{2+} citosólico libre (226).

Estas últimas secuencias descritas se hallan bajo control de una activación de adrenorreceptores beta y son los mecanismos que conducen a la relajación muscular.

En el útero, las aminas adrenérgicas son excitatorias o inhibitorias de la motilidad, dependiendo de la especie (177).

Marshall (151) observó que la inhibición por agonistas de adrenorreceptores beta de la motilidad del útero de rata, está caracterizada por un bloqueo de la descarga de potenciales de acción y de las contracciones musculares, seguido de hiperpolarización de la membrana celular miometral y por una reducción de la tensión de reposo. Como estas acciones no se vieron afectadas por tetrodotoxina, atropina o bloqueantes de adrenorreceptores alfa, pero fueron abolidas por bloqueantes beta, se concluyó que las mismas eran el resultado de una acción directa de la amina sobre los adrenorreceptores beta de las células del miometrio.

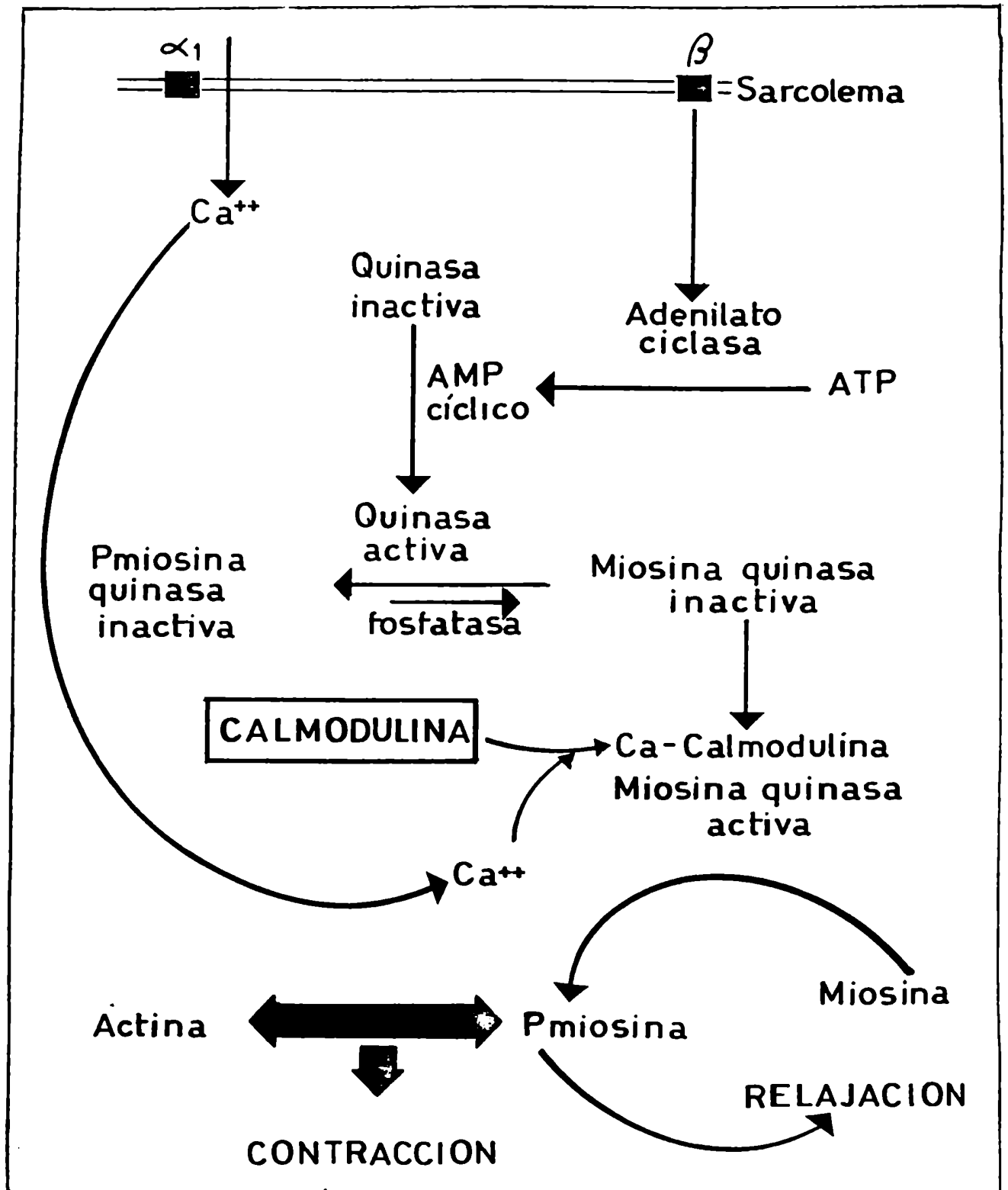


Fig. 10: Participación de las catecolaminas en el proceso contráctil

3. Prostaglandinas

3.1 Generalidades

Kurzok y Lieb (151) en 1930 observaron que el miometrio sufría contracciones cuando se le aplicaba plasma seminal humano. Este efecto fue observado posteriormente por Von Euler (260)(261), quien creyendo que provenía de próstata le dió el nombre de prostaglandinas (PGs) al factor farmacológicamente activo que se hallaba en el espermatozoides humano. Ese nombre fue conservado a pesar de descubrirse algo más tarde que las vesículas seminales eran una fuente importante de ellas.

Bergström (20), continuando con los trabajos de Von Euler demostró que la actividad biológica citada se debía a un nuevo tipo de sustancias: ácidos insaturados liposolubles.

Bergström y Sjövall (23)(25)(26)(27) aislaron en forma pura cristalina las primeras dos prostaglandinas, PGE_1 y PGF_2 . Por ultramicroanálisis y espectrometría de masa demostraron (28) que sus fórmulas empíricas eran $(\text{C}_{20} \text{H}_{34} \text{O}_5)$ y $(\text{C}_{20} \text{H}_{36} \text{O}_5)$, respectivamente. Posteriormente se aislaron y determinaron las estructuras de diversas PGs (24)(220).

La distribución de las PGs en el reino animal es amplia y pueden hallárselas en casi todos los tejidos de mamíferos, en vertebrados inferiores y aún en invertebrados. También se ha-

llan en el reino vegetal, inclusive en corales y algas azules (223) (16).

La opinión corriente es que estas sustancias son sintetizadas y liberadas de los tejidos, sin almacenamiento apreciable en los mismos (208)(32).

Poseen gran versatilidad de acción y amplio rango de efectos: aumentan o disminuyen la presión arterial, contraen o relajan numerosos músculos lisos, participan en mecanismos de secreción, afectan el metabolismo lipídico y de hidratos de carbono, intervienen en el trabajo de parto, la ovulación, la luteólisis y la implantación del óvulo fertilizado, controlan la transmisión neural en el sistema nervioso simpático y se han descripto muchas funciones en el sistema nervioso central.

Además de su reconocido papel fisiológico, su exceso o defecto se considera como factor etiológico de muchos desórdenes funcionales: procesos inflamatorios, alérgicos, dismenorrea, diabetes, síndrome de Bartter, amenaza de aborto, todos ellos por causa de una síntesis aumentada de dichos autacoides. Una síntesis disminuida puede conducir a úlcera péptica, infertilidad masculina e hipertensión arterial.

3.2 Estructura química

Son ácidos grasos cíclicos, oxigenados de 20 C, con estruc-

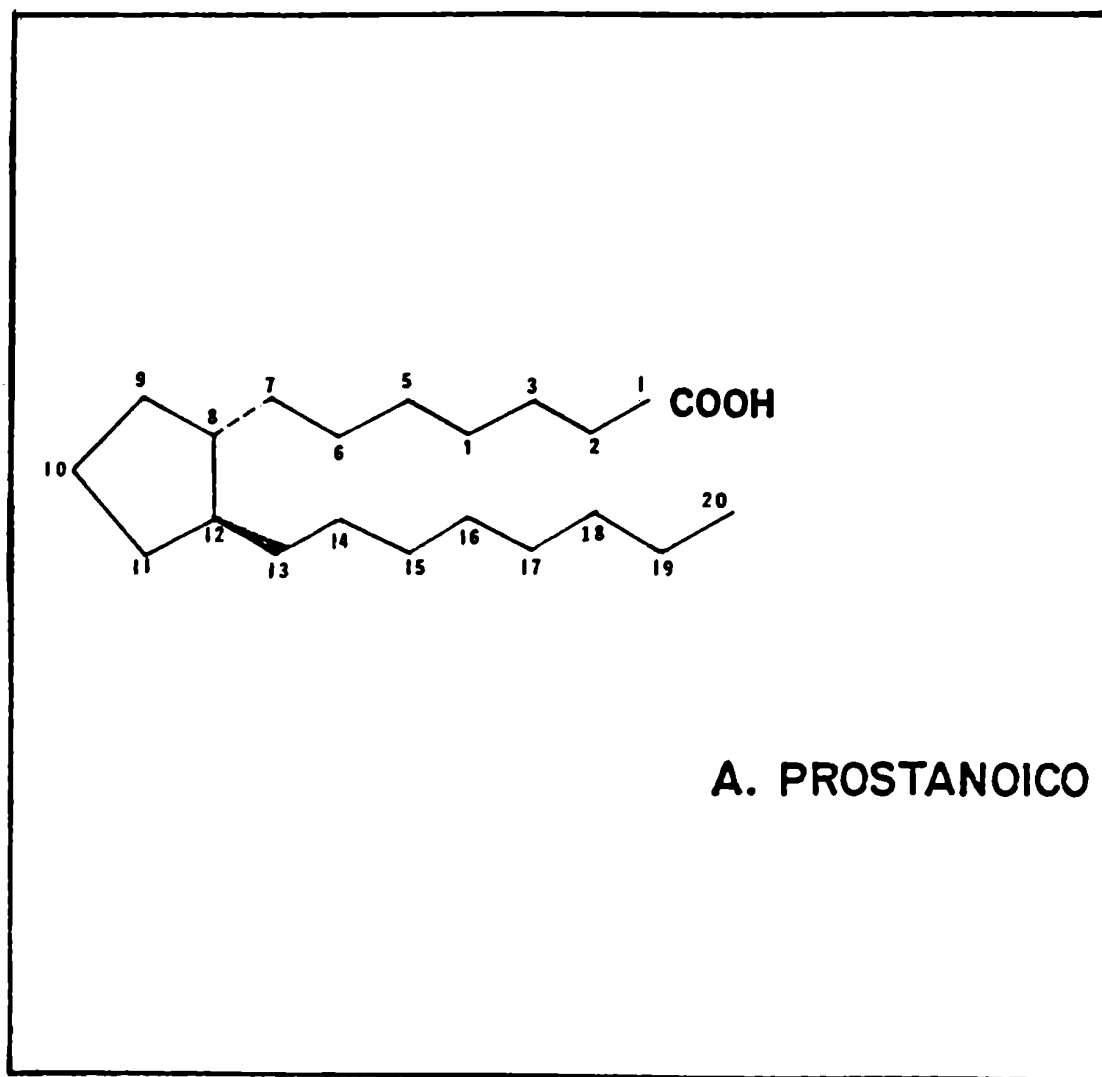


Fig. 11: Esqueleto hipotético del ácido prostanoico

tura que recuerda el esqueleto del hipotético ácido prostanoico (ácido orgánico con una unidad ciclopentano sustituida) (Fig. 11)

Las PGs naturales se dividen en 3 series: la serie 1 presenta una sola doble ligadura entre las posiciones 13-14, la 2 tiene una adicional entre C5 y C6 y la 3, otra doble ligadura localizada entre el carbono 17 y 18 (Fig. 12).

Las PGs se clasifican además en tipos A B C E F, según la naturaleza de los sustituyentes del ciclopentano (Fig. 13). Todos los tipos tienen oxígeno en posición 9 (cetona en los tipos A B C E y oxhidrilo en los tipos D y F y presentan doble enlace trans entre C13 y C14.

En C11 los grupos E y F poseen una función oxhidrilo, cetona en el D y carecen de oxígeno en esa posición el A B y C. La función hidroxilo en el C15 es característica de todos los tipos.

Estudios sobre la biosíntesis de PGs demostraron que las PGE y PGF se forman a partir de un mismo precursor (13).

Samuelsson (221), al descubrir que los oxígenos del anillo pentano de los prostanoideos se originan de la misma molécula de oxígeno, propuso la existencia de un endoperóxido intermedio (Fig. 14). Este fue posteriormente aislado (98) y se verificó que poseía actividad biológica. Este intermediario fue llamado PGH y presenta un enlace peróxido interno entre los

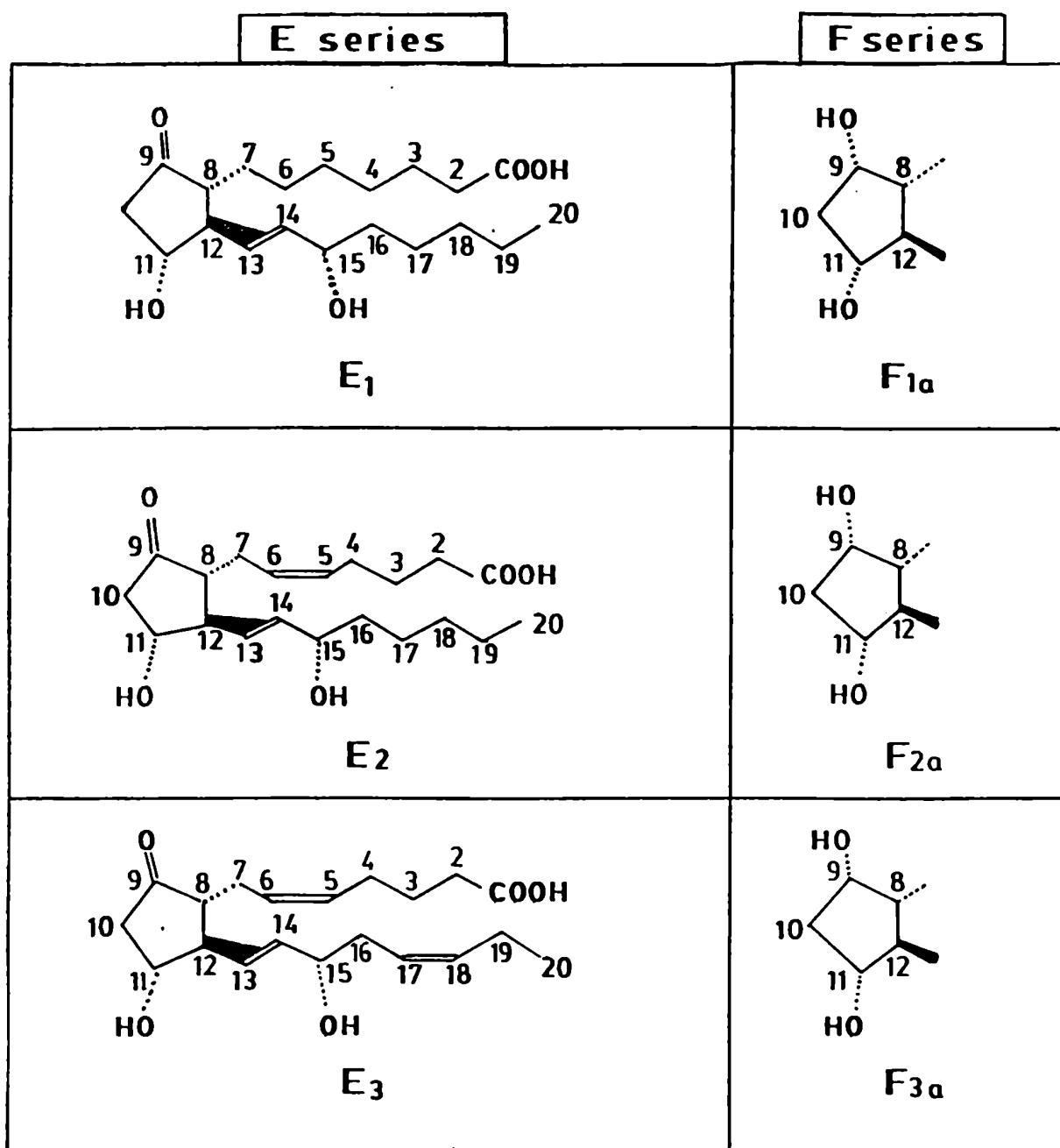


Fig. 12: Estructura química característica de las series
1, 2 y 3

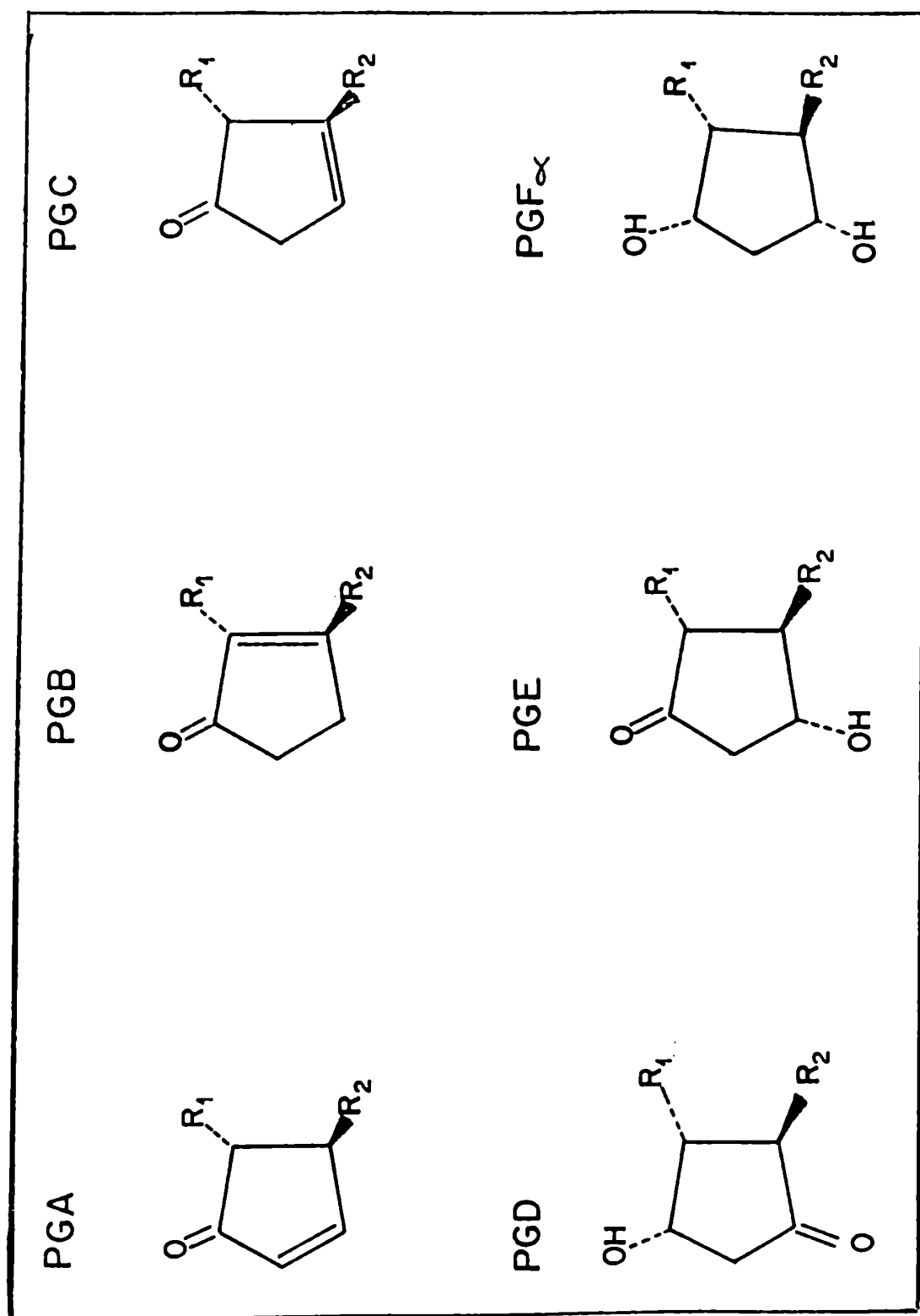


Fig. 13: Sustituyentes en el ciclopentano característicos de las PGs tipo A B C D E y F

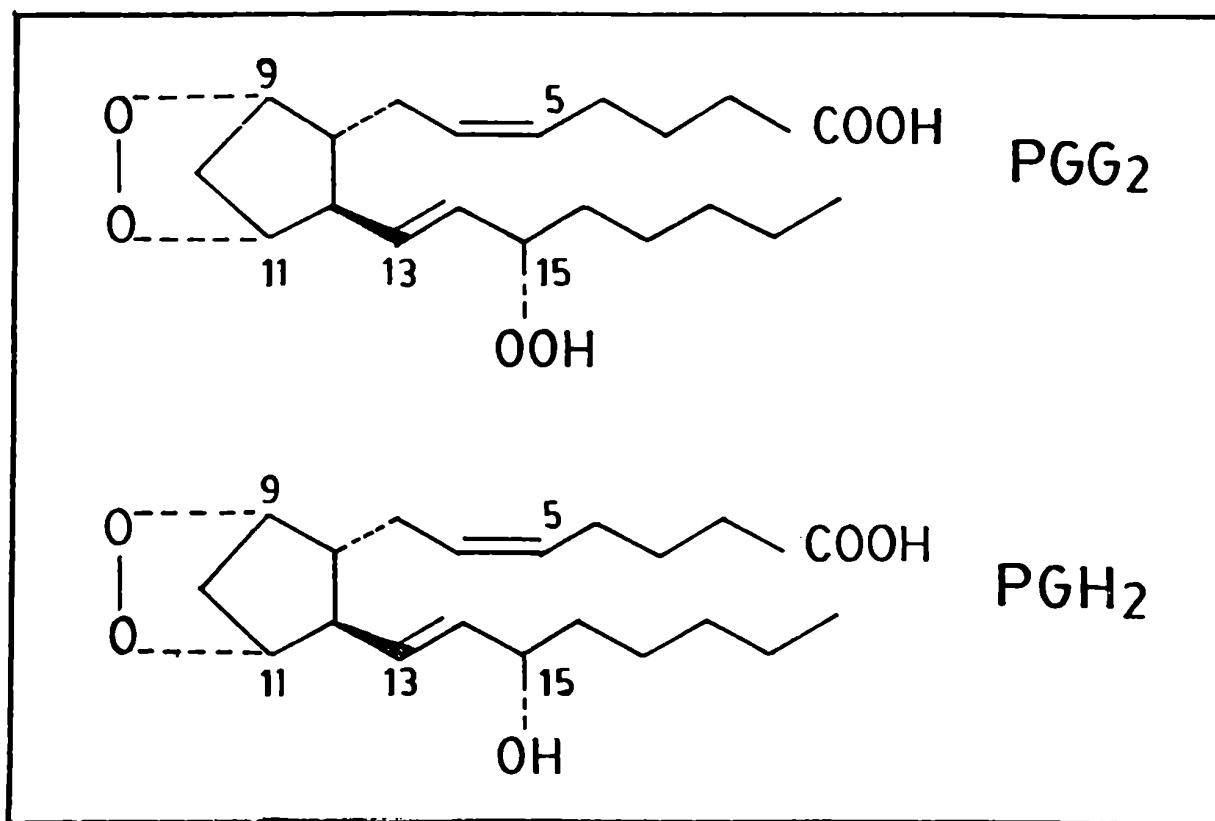


Fig. 14: Endoperóxidos intermediarios

C9 y C11 y dos cadenas laterales similares a las de las PGs E y F.

Más tarde se aisló otro endoperóxido que poseía además un grupo hidroperóxido en C15, al cual se denominó PGG2 (198).

Además de los prostanoïdes estables, los endoperóxidos generan productos inestables (Fig. 15) : prostaciclina (PGI2), hallada en endotelio vascular (184) con un puente oxígeno que une el C9 del anillo al C6 de la cadena lateral que se transforma en su producto estable 6-ceto PGF1 alfa donde desaparece el puente oxígeno pero presenta un oxhidrilo en C9 y cetona en C6 y el tromboxano (Fig. 15) A2 (TXA2) (101)(102)(103), reconocido en plaquetas y en arterias mesentéricas con un átomo de oxígeno insertado en el anillo. Este se convierte en un compuesto estable, el TXB que carece de él pero posee función oxhidrilo en C9 y C11.

3.3 Biosíntesis

Las PGs son biosintetizadas a partir de ácidos grasos poliinsaturados (253) (22) :

8,11,14 eicosatrienoico (dihomo gama linoleico)(C20:3w6)

5,8,11,14 eicosatetraenoico (araquidónico) (C20:4w6)

5,8,11,14,17 eicosapentenoico (C20:5w3) ; los cuales dan origen a las PGs de la serie 1 2 y 3 respectivamente (Fig. 16)

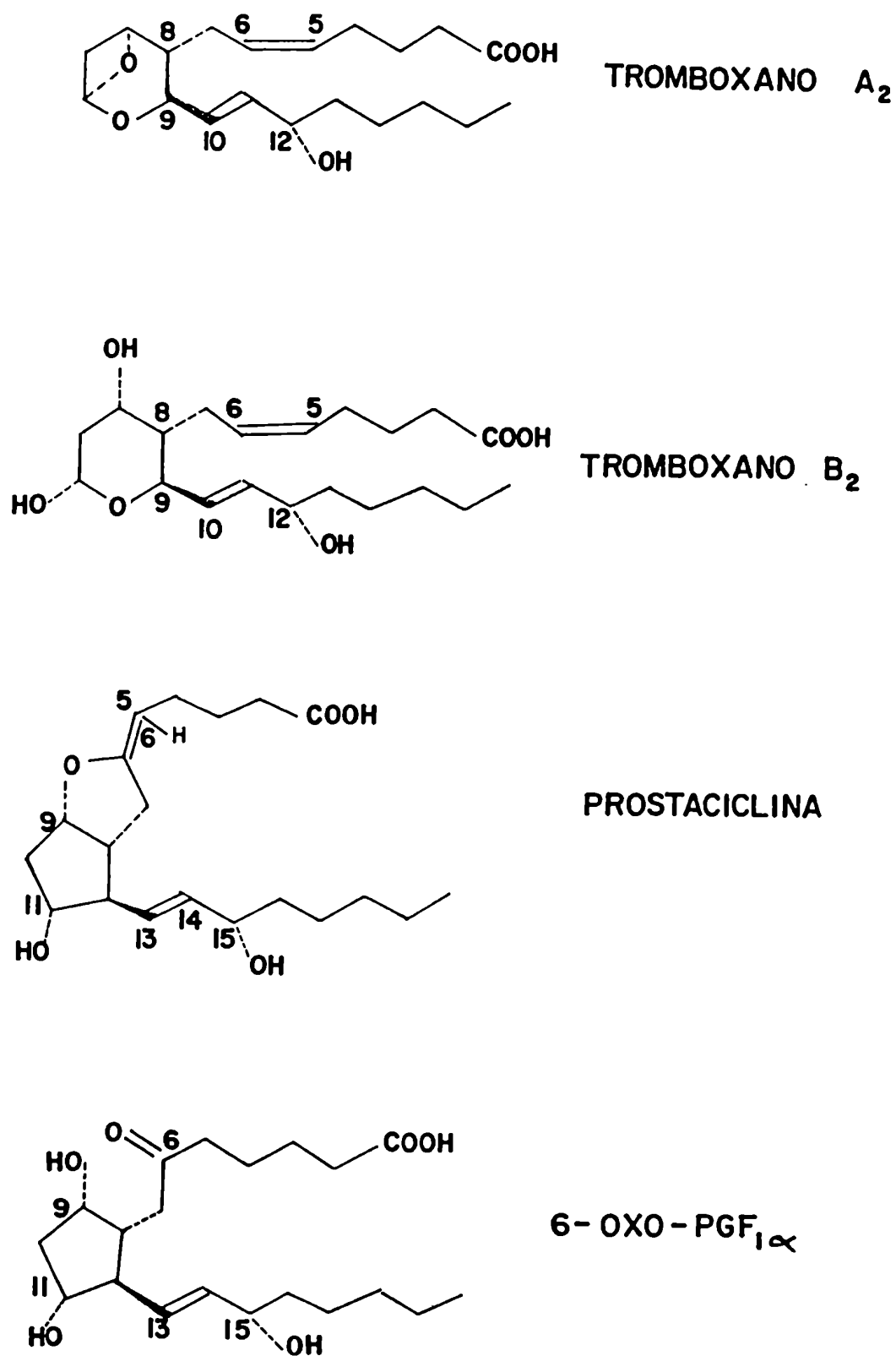
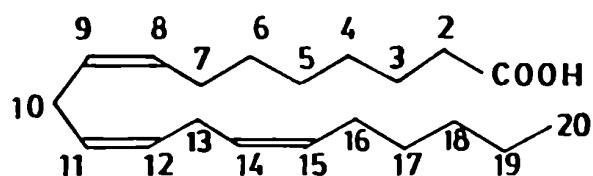
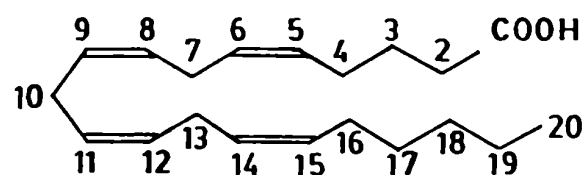


Fig. 15: Estructura química de Tromboxano y Prostaciclina

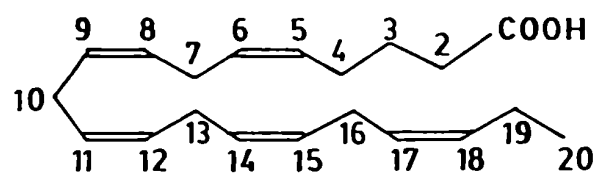
PRECURSOR



Dihomo - γ - linolenico
8,11,14 C_{20:3}



Arachidónico
5,8,11,14 C_{20:4}



Eicosapentaenoico
5,8,11,14,17 C_{20:5}

Fig. 16: Ácidos grasos precursores de las PGs de las series 1, 2 y 3

El ácido araquidónico junto con sus precursores, linoleico (9,12 octadecadienoico), gama linolénico (8,11,14 eicosatrienoico) y el alfa linolénico (9,12,15 octadecatrienoico) del cual deriva el 8,11,14,17 eicosapentenoico; son ácidos grasos esenciales (39).

Los vegetales superiores sintetizan ácidos linoleico y linolénico pero no forman araquidónico. Como los dos primeros no son sintetizados por los animales, éstos deben recibirlos presintetizados de los vegetales (39).

En animales, estos ácidos grasos se encuentran formando triglicéridos, fosfolípidos y ésteres de colesterol.

El ácido araquidónico es el de concentración más abundante en los fosfolípidos de membrana, aunque la mayor cantidad se halla en los triglicéridos. Puede obtenerse directamente de la dieta o por desaturación y elongación de cadena del ácido linoleico de la dieta. Luego de su absorción es transportado en sangre unido en su mayor parte a la albúmina y es incorporado como componente estructural de los fosfolípidos de membrana y otras estructuras subcelulares. En el útero de cobayo, existen pequeñas cantidades de ácido dihomogamalinolénico, precursor de la serie 1 y en contraposición, el ácido araquidónico, precursor de la serie 2, es muy abundante (157)

Para que se inicie la síntesis de PGs a partir de los ácidos grasos, éstos no deben estar esterificados. Dado que la forma libre de tales ácidos se encuentra generalmente en baja concen-

tración, deben liberarse de los depósitos. La liberación de los precursores de almacenamiento, principalmente en fosfolípidos, es llevada a cabo por un grupo de acilhidrolasas tales como la fosfolipasa A_2 y la triglicérido lipasa (150) (Fig. 17)

La fosfolipasa A_2 de la membrana celular, juega un papel importante en la biosíntesis de PGs ya que los fosfolípidos son una fuente muy rica en ácido araquidónico. Como en el ovario el ácido araquidónico se halla además asociado al colesterol como araquidonato de colesterol, la colesterol esterasa estimulada por la hormona luteinizante (LH) es la que libera dicho ácido graso llevando a la síntesis de PGs (146). En plaquetas, la liberación del ácido araquidónico, inducida por trombina, puede implicar la operación secuencial de varias enzimas (173).

Para que ocurra la síntesis de PGs, el ácido liberado debe ser tomado por la enzima que inicia lo que se conoce como la cascada del araquidonato, sin embargo, puede encontrar varios impedimentos para interactuar con dicha enzima: unión a otras proteínas del citosol o fluídos extracelulares, competición por la enzima con otros ácidos grasos, reesterificación a los lípidos por una acilasa. Es así como, aún cuando existan elevadas concentraciones de sustrato libre, es muy poco el disponible para la producción de PGs. Se han realizado investigaciones con el objeto de determinar la existencia de una liberación selectiva, localizada en las proximidades de la enzima (126).

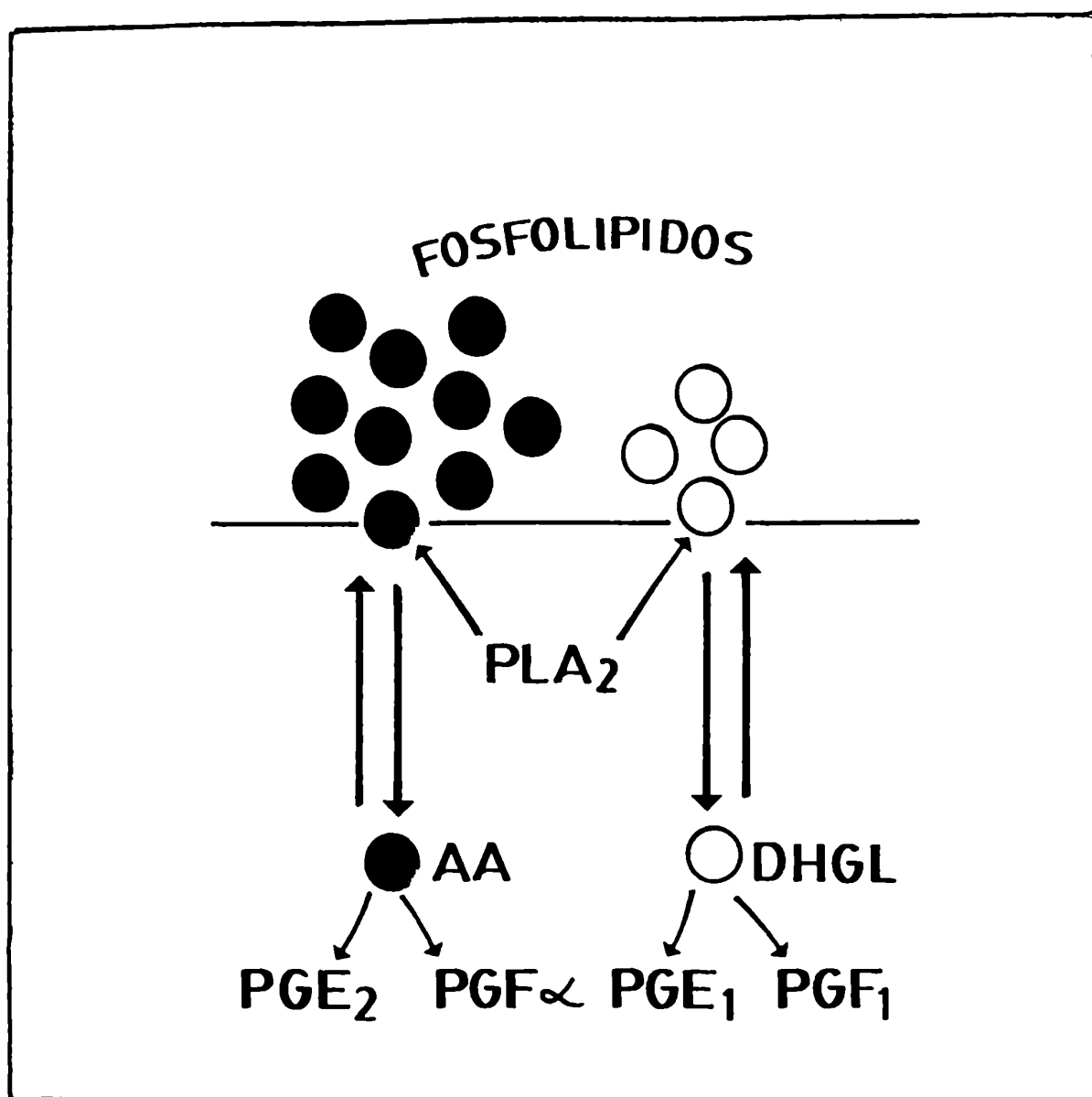


Fig. 17: Liberación de ácidos grasos precursores de PGs de los fosfolípidos de membrana por acción de la Fosfolipasa A₂

La conversión del ácido graso a prostaglandinas, prostaciclina y tromboxano ocurre en dos pasos: el primero, que es catalizado por la ciclooxigenasa, da como resultado la oxigenación y ciclización del ácido dando los intermediarios inestables llamados endoperóxidos (104); el segundo paso implica otras enzimas y resulta en la formación de productos característicos de cada tejido (Fig. 18).

El complejo enzimático que cataliza el primer paso fue solubilizado y purificado por primera vez en vesícula seminal bovina (180)(179) y resuelto en dos componentes: una de las enzimas convierte los ácidos precursores en los endoperóxidos PGG y PGH, mientras que la otra convierte PGH en PGE. A la primera se la llama endoperóxido sintetasa o ciclo-oxigenasa y a la segunda, endoperóxido E isomerasa.

La ciclooxigenasa cataliza la conversión a PGG. Esta reacción requiere oxígeno molecular y es dependiente de un grupo hemo. Se requiere un hemo por cada dos subunidades.

El PGG es el primer producto formado, pero incluso las preparaciones purificadas convierten PGG a PGH, y ello se debe a que la ciclo-oxigenasa tiene además actividad de peroxidasa (179).

La endoperóxido E isomerasa es una enzima microsomal (179) que requiere glutatión para la isomerización de PGH a PGE.

La enzima que sintetiza TXA_2 a partir de endoperóxido PGH fue descubierta en la fracción particulada de alta velocidad

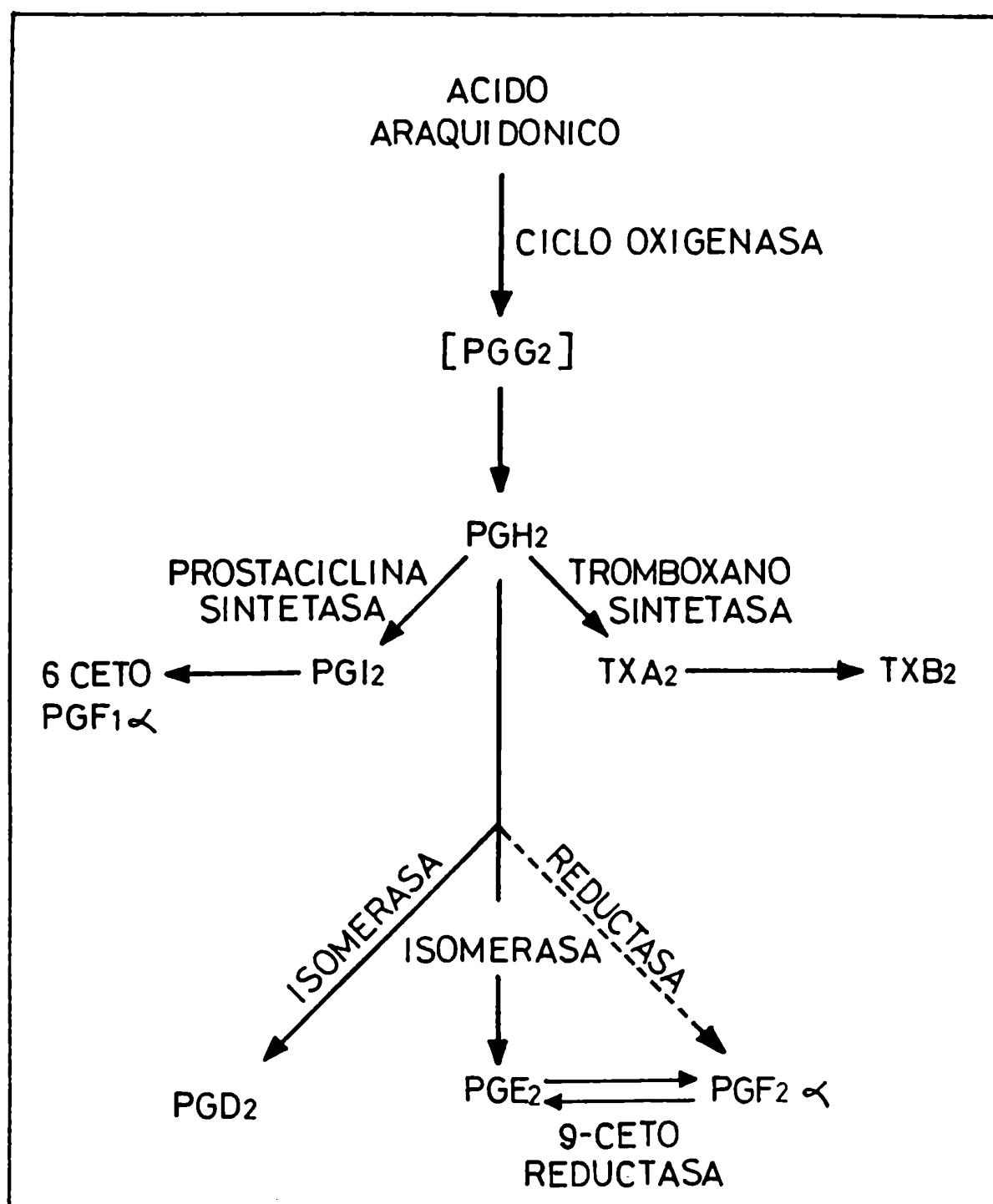


Fig. 18: Cascada del ácido araquidónico

de plaquetas humanas, de caballo y de otras especies (192)(246) (186). El TXA_2 se hidroliza espontáneamente dando TXB_2 que tiene una vida media de 30 segundos a 37 C.

La 11 ceto isomerasa es la enzima que en presencia de glutathion forma PGD a partir de los endoperóxidos (198) que es la principal PG de cerebro (2) y plaquetas (200).

La enzima endoperóxido reductasa que forma PGF a partir de PGH, se halló en microsomas de útero de cobayo (271)

La prostaciclina sintetasa es una enzima microsomal que convierte PGH en el compuesto inestable PGI_2 , cuya vida media en sangre a 37 C es de 2-3 minutos, hidrolizándose espontáneamente a 6-ceto PGF_1 alfa. Se forma en casi todos los tejidos vasculares (43)(65)(185).

3.4 Metabolismo

El ácido araquidónico es metabolizado por beta oxidación, de la misma forma en que lo hacen todos los ácidos grasos, elongación de cadena y autooxidación, lo que implica un proceso de formación de hidroperóxidos por un mecanismo de radicales libres.

Las PGs sufren una rápida pérdida de su actividad biológica, lo cual está asociado a la oxidación enzimática del grupo alcohol del C15 por una 15 hidroxí PG deshidrogenasa (12) (191) (230),

formándose un grupo cetona. Esta enzima está ampliamente distribuida en los tejidos de mamíferos (12)(14)(196)(202) (Fig. 19).

Lee y col. (159) sobre la base del cofactor utilizado, NAD^+ ó NADP^+ , propusieron la existencia de 2 tipos diferentes de enzimas.

La oxidación de las PGs es seguida por una reducción del doble enlace 14-13 trans para dar el dihidroceto derivado. Estos metabolitos son muy abundantes en circulación periférica y persisten en ella con vidas medias de alrededor de 8 minutos (222) (Fig. 19). La reacción es catalizada por una 13 reductasa que requiere como cofactor al NADH ó NADPH (12). El sustrato de esta enzima debe poseer un carbonilo en C15 (99).

Luego de la 15 deshidrogenación y la reducción del doble enlace en 13-14 puede ocurrir beta oxidación de la cadena carboxílica lateral (97) o bien omega oxidación. Ambas tienen lugar in vivo fundamentalmente en hígado (82) (100).

La metabolización del TXA a TXB parece no ser enzimática y ocurre rápidamente (104). Estudios realizados en monos por Roberts (217)(218) revelaron que el camino metabólico principal del TXB era vía la dehidrogenación del grupo hidroxilo del C11, llevando a la formación del 11 dehidro tromboxano B.

El metabolismo de la PGI a la 6-ceto PGF_1 alfa ha sido estudiado en animales enteros (272)(247)(203) (Fig. 20). La en-

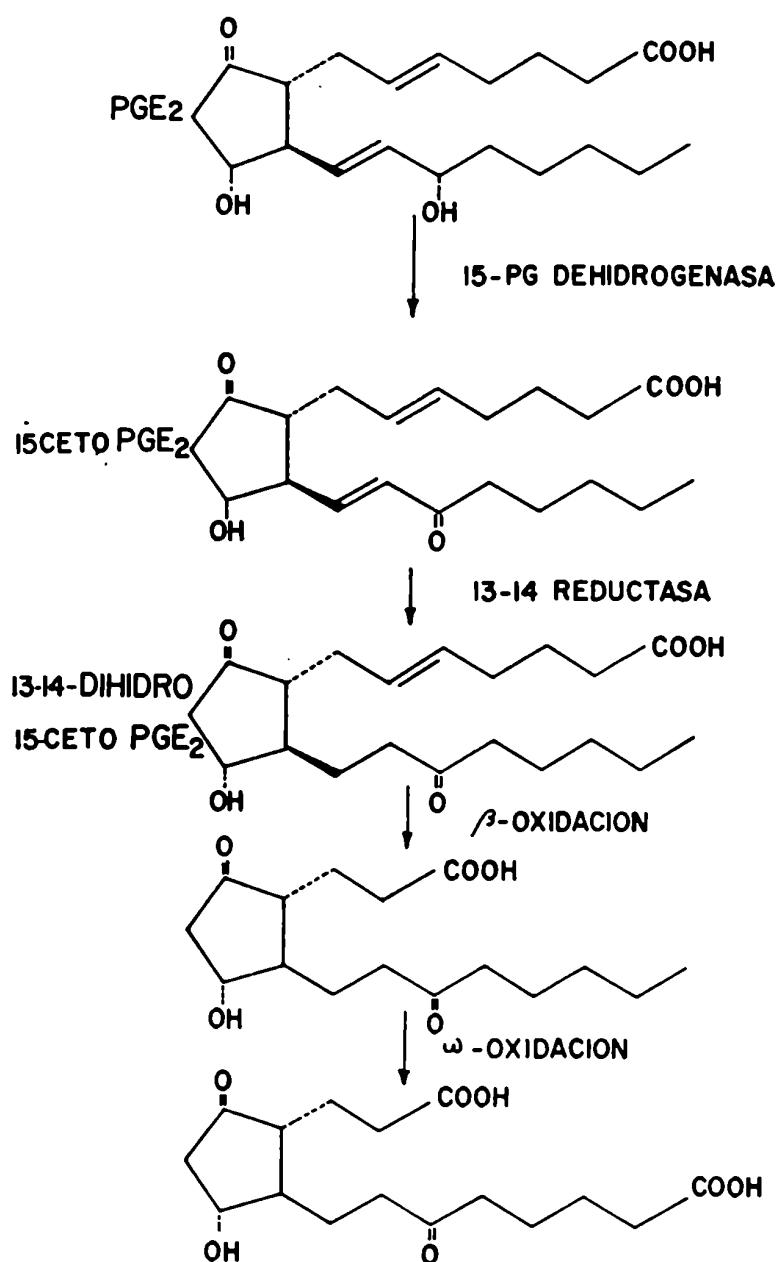


Fig. 19: Metabolismo de prostoglandinas

zima 15 dehidrogenasa puede usar como sustrato tanto a PGI_2 como a 6-ceto PGF_1 alfa. Esta última se convierte in vivo en el 15 ceto metabolito. En consecuencia, la 6,15-diceto PGF_1 alfa puede ser formado por dos caminos diferentes. A partir de este último metabolito se originarían otros por beta oxidación.

Un porcentaje elevado del metabolismo de PGs ocurre en el pulmón. Allí se remueve la mayoría de la PGE_2 y la PGF_2 alfa de la circulación (69). Además, parte de la PGE_2 es eliminada por la acción de hígado y riñón, lo cual determina una limitación para ejercer efectos sistémicos. Como una gran proporción de PGI_2 no se metaboliza en pulmón, haciéndolo preferentemente en hígado y riñón, la PGI_2 podría entrar en la circulación sistémica y funcionar como hormona.

3.5 Inhibidores

Existen varios tipos de inhibidores: a- análogos de sustrato b- drogas antiinflamatorias no esteroideas tipo aspirina c- esteroides antiinflamatorios.

a- Ahern y Downing (7) demostraron que un análogo acetilénico del ácido araquidónico, el eicosa 5,8,11,14 tetraenoico (5a8a14a 20:4 TYA) producía una inhibición irreversible de la síntesis de PGs sin ser sustrato del sistema enzimático endoperoxido sintetasa.

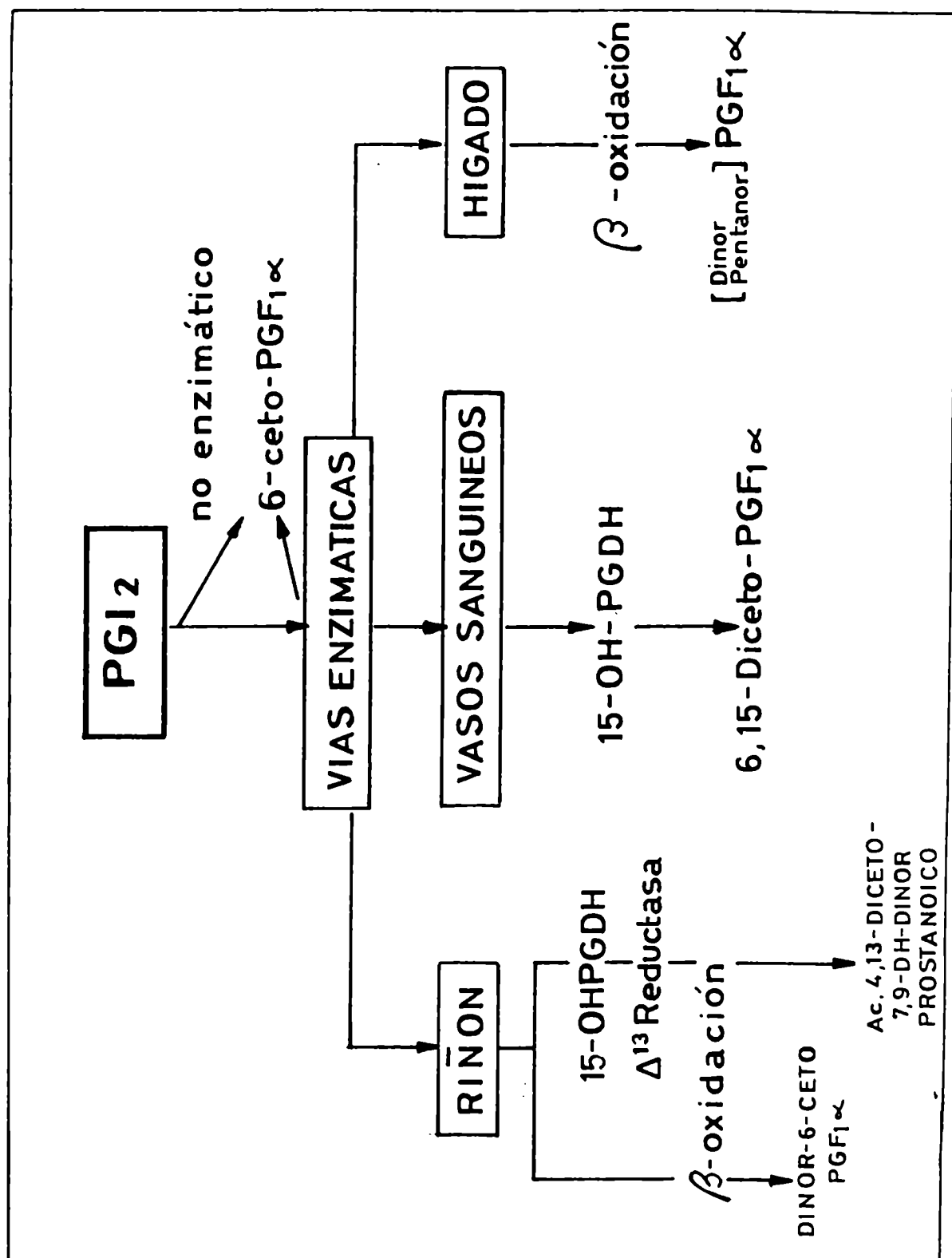


Fig. 20: Metabolismo de la prostaciclina

Los análogos acetilénicos de los sustratos así como algunos otros ácidos grasos naturales ejercen una inhibición de tipo bifásica con un efecto instantáneo dependiente de la concentración y una acción tardía debido a la destrucción irreversible del sitio catalítico de la enzima (154)(255).

Por otro lado, los isómeros de posición del ácido araquidónico y dihomogama linolénico inhiben irreversible y competitivamente la enzima(197).

A pesar de que estos análogos de sustrato son efectivos en algunas preparaciones tisulares in vitro, no se utilizan in vivo dado que no se conoce con exactitud la absorción, excreción y distribución de los mismos.

Los inhibidores mencionados actúan impidiendo que tenga lugar la cascada del araquidonato.

Existen inhibidores que son específicos para ciertos caminos dentro de la cascada, los hay para TXA y para PGI.

Son varios los inhibidores conocidos para la tromboxano sintetasa: imidazol (182), 1-(isopropil-2-indoil)3-piridil-3-cetona conocido como el L8027 (104) y ciertos análogos del ácido araquidónico como el 15-HPAA (183).

La tranilcipromina (92) inhibe la PGI₂ sintetasa.

b- Las drogas antiinflamatorias no esteroideas tipo aspirina presentan estructuras químicas variadas, aunque todas compar-

ten con la aspirina su acción antipirética, analgésica y anti-inflamatoria.

Ku, Lands y otros indicaron que la mayoría de estas drogas son inhibidores competitivos irreversibles de la endoperóxido sintetasa (145)(235).

La mayoría de los compuestos probados inhiben por igual la formación de todos los productos de la ciclooxigenasa (74).

Experimentos con enzimas purificadas formadoras de PGs, mostraron que estas sustancias inhiben a la endoperóxido sintetasa pero no la endoperóxido PGE isomerasa (180). Además, sólo es inhibida la actividad de ciclo oxigenasa, no alterándose la de peroxidasa (179).

Las drogas de uso más corriente para la inhibición de la síntesis de PGs son: la indometacina y el ácido acetil salicílico. Aunque existe gran variedad de ellas: SU 21524, ácido meclofenámico, ácido mefenámico y ácido flufenámico, es discutido todavía cual es el mecanismo de acción de cada una pero se piensa que la aspirina actuaría como un agente acetilante del sitio activo de la enzima (219).

c- Flower y col. (75) demostraron que la biosíntesis de PGs a partir del ácido araquidónico por la fracción microsomal de homogenatos de bazo de perro era inhibida por indometacina y fenamatos, pero no por hidrocortisona ó dexametasona. Estos últimos tampoco alteraban la enzima PG sintetasa microsomal de vesícula seminal bovina, médula de riñón y cerebro de conejo.

Todas las evidencias indicaban que los corticoides no eran inhibidores de la ciclooxigenasa microsomal.

Lewis y col(162) publicaron los primeros datos concernientes a la inhibición de la liberación de PGs por corticosteroides antiinflamatorios y propusieron que este efecto no se debía a la inhibición de la síntesis por el tejido sino a una inhibición de los mecanismos de transporte de membrana de las PGs.

Gryglewski y col. (93) propusieron en cambio que los corticoides inhibían la liberación de araquidónico de los fosfolípidos al disminuir la actividad de la fosfolipasa A_2 , decreciendo así el sustrato disponible para la síntesis de PGs (el ácido araquidónico).

Más tarde (60)(62) se halló que la inhibición de la síntesis de PGs por cortisol tenía un período de latencia, y que su acción era prevenida por inhibidores de la síntesis de RNA o proteínas.

Flower y col (73) descubrieron un factor inducido por esteroides que mimetizaba los efectos antifosfolipásicos de los agentes antiinflamatorios. Propusieron que ese factor era un péptido o una proteína, a la cual denominaron macrocortina. Se observó que su síntesis era estimulada por glucocorticoides y que ésta era capaz de inhibir la actividad de fosfolipasas.

Hirata (118) demostró que la fosforilación de la lipomodulina o macrocortina por una proteína quinasa dependiente de AMP

cíclico, causaba una disminución de su acción inhibitoria sobre la fosfolipasa A_2

Además de los tres tipos de inhibidores mencionados, existen compuestos tales como el PPP (polifloretilo fosfato) capaz de antagonizar selectivamente las acciones estimulantes de las PGs E y F sobre el músculo liso. Eakins (166) describe antagonismos del PPP sobre las respuestas contráctiles de PGE_2 y PGF_2 alfa en útero de rata, cobayo, conejo y mono, siendo los mismos reversibles y competitivos.

Otro antagonista de la acción de PGs es el denominado SC 19220 (53).

Fue también observado que el PPP no disminuía la unión específica de PGE_1 a su receptor y se postuló que actuaría en un sitio próximo del receptor para PGs. Se halló así mismo que el SC 19220 tiene poca afinidad para los receptores de PGs por lo que su actividad anti PG permanece sin explicación (148).

3.6 Receptores

La primera evidencia experimental de receptores para PGs fue comunicada por Kuehl y col. (149) en 1972. Los autores demostraron una unión específica de PGE_1 tritiada a fracciones particuladas obtenidas a partir de homogenatos de adipocitos de rata. El descubrimiento de sitios receptores en los

órganos blanco donde las PGs originan variadas acciones, ha valorizado el papel que ejercen las mismas en los procesos fisiológicos. Así, para la PGF_2 alfa, considerada como la hormona luteolítica en la mayoría de los mamíferos, Kirton(142). Se han hallado receptores específicos en cuerpos lúteos ovinos, bovinos y humanos (210) (211) (212).

Prior (213) describió en concordancia con el hecho de que la PGE_2 es un estimulador más potente que la PGF_2 alfa de la actividad uterina humana, que las membranas uterinas humanas presentan sitios de unión específicos que unen PGE_2 con mayor afinidad que PGF_2 alfa.

Receptores para PGs se han hallado también en estructuras neuroendócrinas como la glándula pineal (48) y el hipotálamo (167), en cuyos procesos bioquímicos y funcionales básicos parecen estar implicadas varias PGs (47).

3.7 Influencia de las hormonas sexuales en la biosíntesis uterina de PGs

La influencia de los esteroides sexuales sobre la biosíntesis de PGs por el útero ha sido ampliamente explorada y aceptada, aunque los resultados son en general contradictorios.

Sharma y col. (229) hallaron que el estradiol incrementa la producción de PGE y PGF en el útero de rata ovariectomizada. Sin embargo Kuehl (147) señaló una acción diferencial del es-

tradiol, ya que el mismo incrementó los niveles de PGF pero disminuyó los de PGE. Esto último fue también observado por otros autores (96) (3), hallando además que la progesterona coadministrada con estradiol bloqueaba la acción del estrógeno. En contraposición, Castracane y col (50) observaron que el incremento de PGF inducido por estradiol era potenciado por progesterona, y hallaron que la progesterona sola carecía de efecto.

La acción inhibitoria del estradiol sobre la síntesis de PGE fue descripta también por otros investigadores (240) (250).

Franchi y col. (78), por otro lado, describieron un efecto estimulante de la progesterona sobre la producción de PGF uterina de rata ovariectomizada, el cual era disminuido por acción del 17-beta estradiol.

En vista de que los estrógenos son activadores de la síntesis proteica se postuló que ésta podría estar mediando las acciones del estradiol sobre la síntesis de PGs, a través de alguna inducción enzimática. Sin embargo, Horton y col (123), observaron que el incremento de la síntesis de PGF inducido por estradiol, se manifestaba mucho antes de que la síntesis proteica tuviera lugar. Además, Castracane y col. (50) mostraron que la administración simultánea de inhibidores de síntesis proteica o sustancias antiestrogénicas con estradiol, no afectaba la acción de este último sobre la producción uterina de PGs.

Recientemente se ha hallado (61) en ratas hipofisectomiza-

das implantadas con cápsulas plásticas de estradiol, que éste incrementaba la actividad de la fosfolipasa A_2 (enzima hidrolítica que libera ácido araquidónico de los fosfolípidos). Por lo tanto la acción de los estrógenos sobre la fosfolipasa A_2 podría ser un factor implicado en la modulación por hormonas sexuales de la síntesis de PGs ya que estaría determinando la disponibilidad de sustrato para que tenga lugar la síntesis.

3.8 Papel de las PGs en la motilidad uterina

Estudios de Bergström y col. en 1968 (21) demostraron que las PGs exógenas inducían contracciones uterinas en varias especies de mamíferos. Mas tarde Vane y col. (257) utilizando inhibidores de síntesis de PGs, redujeron la actividad espontánea del útero aislado de rata. Posteriormente los mismos autores, empleando el útero de ratas preñadas de 17 a 22 días (258), observaron que el mismo exhibía contracciones espontáneas al mismo tiempo que se registraba una liberación de sustancias de tipo prostaglandínico. Mediante inhibidores de síntesis de PGs como indometacina, lograron abolir tanto la liberación de PGs como la actividad uterina, restaurándose la actividad contráctil con el agregado de PGs exógenas .

Si bien todas estas evidencias sugerían una participación de las PGs en la motilidad uterina, no se descartaba la posibilidad de que la liberación de PGs fuera la consecuencia y

no la causa de la actividad mecánica. Posteriormente fue desechada esta hipótesis ya que se demostró que la producción de PGs ocurría aún cuando las contracciones uterinas eran abolidas por un relajante muscular tal como la papaverina (9).

Gimeno y col. (87) demostraron que concentraciones crecientes de PPP (antagonistas de PGs) producían la reducción creciente de la actividad espontánea del útero aislado de rata ovariectomizada.

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

1. Materiales

1.1 Animales utilizados

Se utilizaron ratas hembras de la variedad Wistar, cuyo peso oscilaba entre 180 y 200 g, en diferentes estadios del ciclo sexual (proestro,estro,metaestro y diestro), los que se determinaron mediante extendidos vaginales efectuados diariamente entre las 9.00 y las 10.00 hs. Se emplearon solamente aquellas ratas que mostraron dos ciclos consecutivos regulares antes del sacrificio, el que se llevó a cabo por un golpe en la cabeza y dislocación cervical.

En los experimentos realizados se utilizaron también hembras inmaduras de 25 días de edad, divididas en 3 grupos experimentales:

Grupo 1: ratas a las cuales se les administró vehículo intraperitonealmente.

Grupo 2: ratas inyectadas intraperitonealmente con una dosis de 17-beta estradiol (0.5ug) y una de la misma hormona (lug) al día siguiente.

Grupo 3: ratas inyectadas subcutáneamente con(lug) de progesterona.

Todos los animales se sacrificaron 24 hs después de la última inyección.

Las ratas fueron mantenidas en un régimen de luz diaria de 14 hs (07.00-21.00) en ambiente climatizado (22 ± 2)C y alimentadas con alimento balanceado "Purina" y agua ad libitum.

1.2 Drogas utilizadas

Sigma Chemical Co:

PGE₂, PGF₂ alfa, PGI₂

Adenosín difosfato (ADP)

Atropina

Propranolol

Indometacina

17-beta estradiol

Progesterona

Folin-Ciocalteus

Albúmina bovina fracción V

Corticosterona

Acido acetil salicílico

Norepinefrina

Isoproterenol

PPO

POPOP

The UpJohn Company

U0521

New England Nuclear, Mass EEUU

DL-Norepinefrina -7-³H(N) (AE 10,4 Ci/mmol)

L-Dihidroalprenolol ³H (AE 90 Ci/mmol)

Protosol

Inulin-Carboxil(AE 1-3 mCi/g)

Merck Co

Acido ascórbico

Placas cromatográficas de Sílica gel G

ciproheptadina

CIBA Co

Regitina

May & Baker

EDTA

cocaína

papel Whatman GF/C

Las sales y solventes utilizados fueron de grado analítico
(Carlo Erba, Mallinckrodt, Merck)

2. Métodos

2.1 Determinación de la motilidad uterina

Los estudios se realizaron empleando in vitro cuernos uterinos de ratas adultas o prepúberes. Para su obtención se practicó una incisión longitudinal medio-ventral. Inmediatamente después de separar los cuernos se los colocó en una cápsula de Petri conteniendo solución de Krebs Ringer bicarbonato (KRB) modificado y se los disecó a temperatura ambiente.

Los cuernos se abrieron longitudinalmente siguiendo la línea del mesometrio y posteriormente se cosieron por los extremos con hilo y aguja.

El tejido se sujetó por el hilo de uno de sus extremos a un soporte de vidrio en forma de J, el cual estaba contenido en una cámara tisular de vidrio de doble pared cerrado en su base, entre las cuales circulaba agua termostatzada a 37 C impulsada por una bomba Edmund Búler UKT 2 (Fig. 21). El hilo del otro extremo tisular se conectó a un transductor Statham ó TMI BHL, capaz de transformar la actividad mecánica del tejido en una señal eléctrica. Esta señal eléctrica era magnificada con un amplificador SAN-EI acoplado a un polígrafo con plumas inscriptoras encargadas de registrar en forma inmediata y continua las curvas producidas por la actividad mecánica del tejido (Fig. 22)

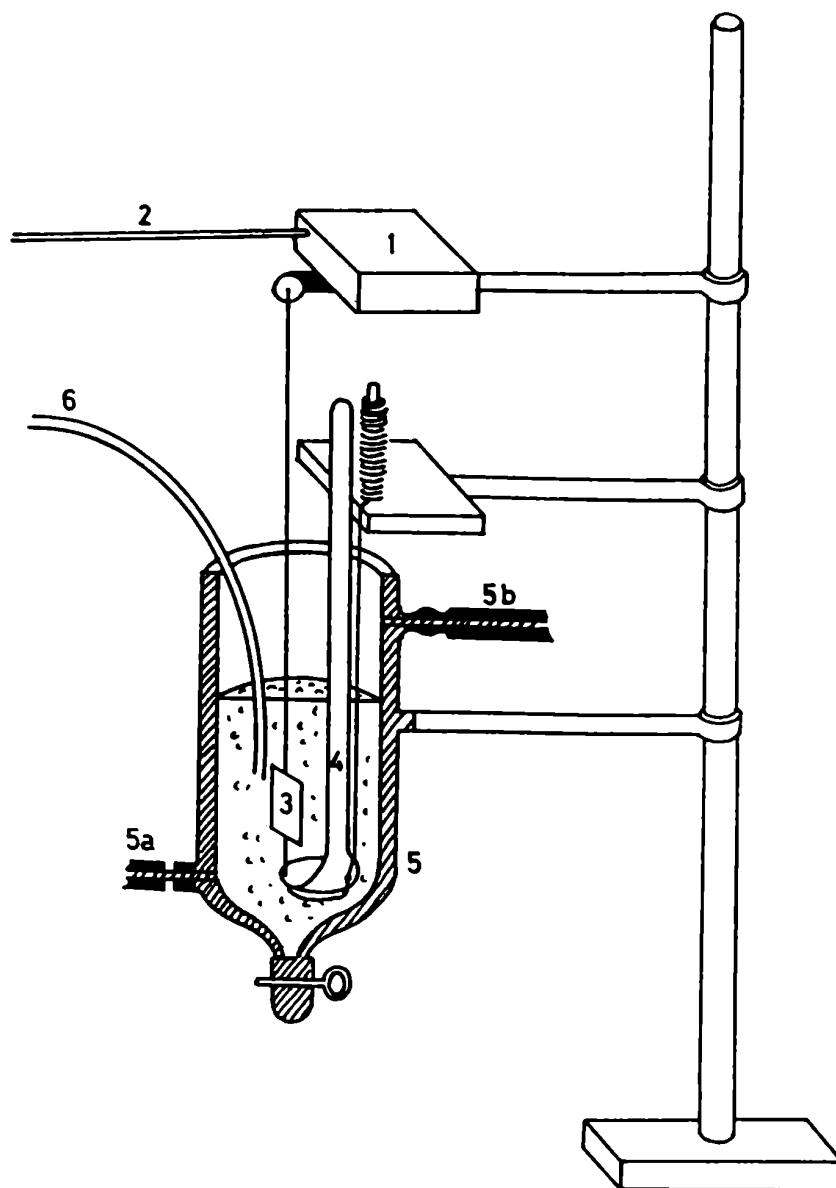


Fig. 21: 1. transductor
 2. cable conector del transductor con el sistema
 - amplificador-registrador
 3. tejido
 4. soporte tisular
 5. cámara tisular, 5a boca de entrada del agua
 circulante externa, 5b boca de salida
 6. burbujeador

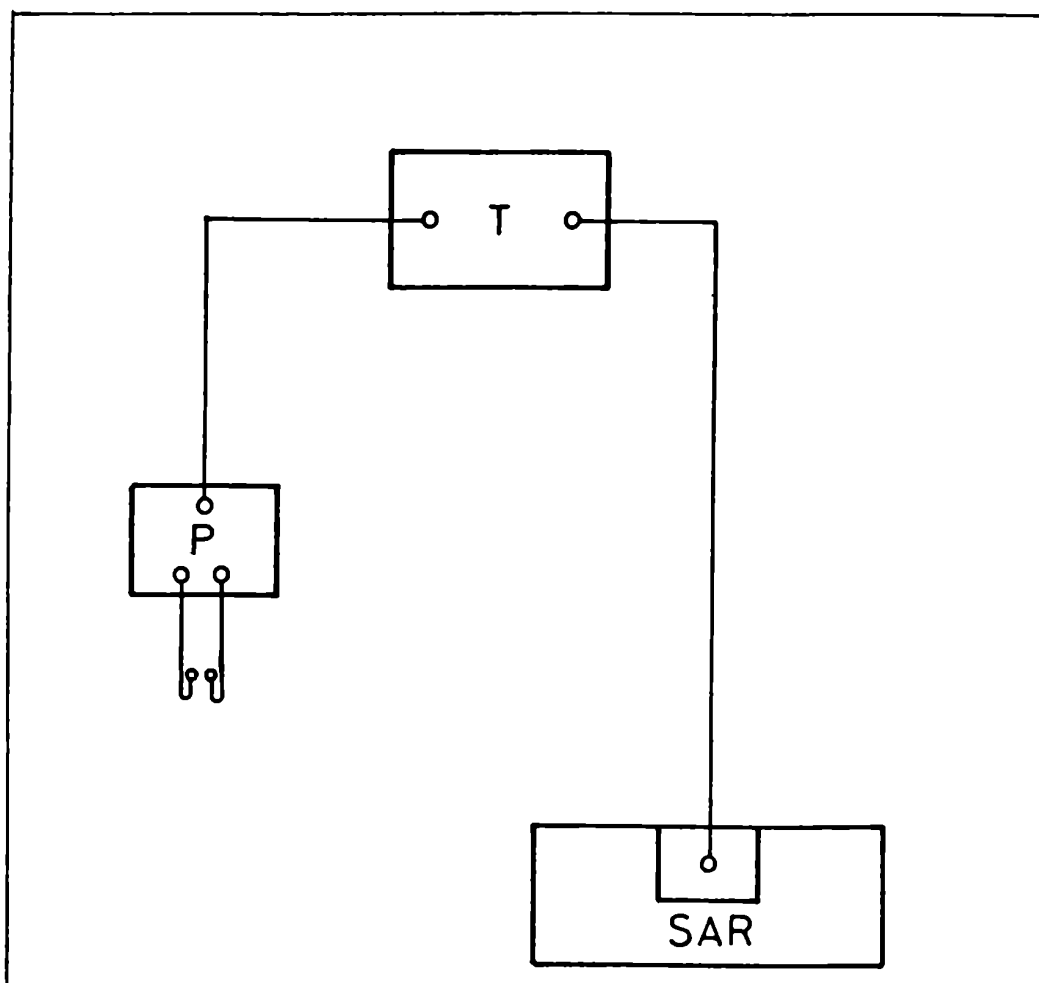


Fig. 22: Esquema del equipo utilizado para registrar la motilidad espontánea del útero aislado de rata
T= transductor
P= preparación muscular
SAR= sistema de amplificación y registro

Como medio de incubación tisular se utilizó una solución buffer KRB a pH 7.4 y que contenía glucosa como sustrato metabólico. La solución KRB tenía la siguiente composición:

Na^+	145mM
K^+	5.9mM
Ca^{2+}	2.2mM
Mg^{2+}	1.2mM
Cl^-	127mM
HCO_3^-	25mM
SO_4^{2-}	1.2mM
PO_4^{3-}	1.2mM

El pH de la solución se mantuvo ajustado en un valor de 7.4 con gas carbógeno (95% de O_2 y 5% de CO_2) a flujo constante.

En todos los experimentos la temperatura del medio nutriente fue estabilizada a 37 C.

Una vez montado el tejido se le aplicó una tensión basal de 1 g. mediante el estiramiento producido gracias a un dispositivo micrométrico, luego de lo cual se registró su actividad contráctil espontánea por un período de 60 minutos. Se consideró como control de dicha actividad al promedio de las contracciones de los primeros 10 min. postaislamiento.

Las variaciones observadas durante la hora de experimentación se cuantificaron en períodos de 10 min. y se expresaron como porcentaje de cambio con respecto a controles internos registrados durante los primeros 10 min después del aislamiento y a los que se consideraban como el 100% de actividad contráctil.

La valoración de la actividad contráctil uterina se realizó teniendo en cuenta los siguientes parámetros:

Frecuencia (F): número de contracciones en 10 minutos

Tensión contráctil isométrica (TCI): tensión desarrollada por el músculo uterino desde el nivel de tensión de reposo hasta el punto de mayor desarrollo de tensión (tensión pico) isométrica. (Fig. 23). Los valores de TCI fueron el promedio de las contracciones individuales registradas en períodos de 10 min. Su valor fue expresado en $\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$ peso seco del tejido.

Para estudiar la reactividad del útero aislado de rata frente a diversos agentes, se realizaron curvas dosis respuesta de tipo acumulativo de acuerdo con el procedimiento descrito por Van Rossum (254), consistente en el agregado de dosis crecientes de una droga cada 2 min y registro simultáneo de la TCI desarrollada.

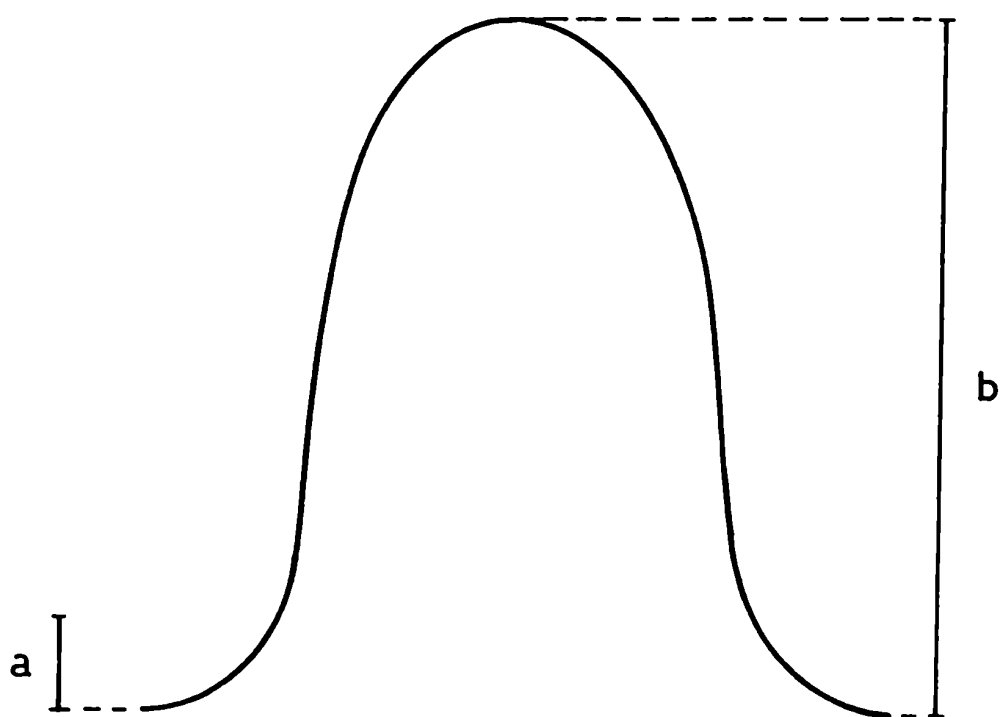


Fig. 23: Parámetros para medir la tensión contráctil isométrica del tejido

- a. trazado de calibración en mg.
- b. medida de la tensión contráctil isométrica en mg

2.2 Técnicas biométricas y radiométricas

2.2.1 Cuantificación de PGs

a) Determinación de PGs tipo E y F

Se estimaron las PGs de tipo E y F liberadas al medio de incubación por los cuernos uterinos aislados de rata montados en la cámara tisular con solución KRB burbujeada con carbógeno y a 37 C bajo una tensión basal de 1 g. En estas condiciones se registraron las contracciones uterinas mediante los dispositivos explicados anteriormente. Luego de 1h de incubación se retiraba el medio nutriente y se lo guardaba a -20 C para la posterior extracción de PGs. Las preparaciones tisulares eran secadas en estufa a 40 C durante 48 hs, luego de lo cual se cuantificaban sus pesos secos.

Para la extracción de PGs se acidificaron los medios de incubación a pH 3 con ClH 1 N y se extrajeron 2 veces con un volumen de acetato de etilo, el cual era luego evaporado por vacío en un evaporador rotatorio a 40 C. El residuo era suspendido en 10 ml de acetato de etilo. La fracción de acetato de etilo se extrajo tres veces con 10 ml de buffer fosfato de K^+ pH 8 y se acidificaban las fases acuosas con ClH a pH 3.

Los ácidos grasos eran luego extraídos con un volumen de cloroformo, repitiéndose la operación tres veces. La fase clorofórmica se evaporaba en vacío a 40 C y el residuo redissuelto en cloroformo-metanol (4:1 v/v) se sembraba en el origen de

una placa de cromatografía recubierta con sílica gel G. La cromatografía se desarrolló en un sistema de solventes cloroformo-metanol-ácido acético-agua(90:9:1:0.65), corriéndose paralelamente placas con PGE_2 y PGF_2 alfa auténticas como testigos. La posición de las PGs de referencia fue visualizada luego de rociar las placas secas con una solución de ácido fosfomolibdico al 15% en etanol y someterlas a 120 C durante 15 min. Los valores de RF para PGE_2 y PGF_2 alfa fueron respectivamente 0.61 y 0.42. En las placas con las muestras, las zonas correspondientes a los valores de los estándares se rasparon y eluyeron con cloroformo-metanol y se llevaron a sequedad bajo vacío.

La estimación cuantitativa de la actividad tipo PG de las muestras se realizó por el método de bioensayo descrito por Vane (256). Este método está basado en la capacidad que tienen las PGs para modificar la actividad contráctil del músculo liso de diversos órganos. Se escogió para los experimentos el estómago de rata, dada su buena sensibilidad a las PGs E_2 y F_2 alfa.

La actividad tipo PG de los eluidos cromatográficos recogidos en 0.2 ml de solución KRB, se estimó sobre trozos de fondo de estómago de rata sometido a superfusión con una solución KRB conteniendo una batería de inhibidores tales como: atropina, regitina, propranolol y ciproheptadina. Estos se utilizaron con el objeto de evitar las respuestas contráctiles del músculo estomacal que pudieran deberse a los siguientes

agonistas: acetilcolina, catecolaminas, serotonina e histamina que podrían ser liberados por esas preparaciones enmascarando las respuestas inducidas por las muestras con actividad de tipo PG allí ensayadas.

Esa solución de perfusión contenía además indometacina (1 μ g/ml) para impedir la formación endógena de PGs por el estómago de la rata.

Las contracciones musculares provocadas por el agregado de las muestras fueron registradas mediante un sistema idéntico al descrito para los estudios de las contracciones, esto es, integrado por un transductor de fuerza contráctil isométrica, un amplificador de las señales eléctricas y un polígrafo inscriptor.

Los bioensayos entre corchetes se llevaron a cabo utilizando PGE₂ o PGF₂ alfa auténticas como testigos y la actividad tipo PG se expresó como equivalentes de PGE₂ o PGF₂ alfa en ng.mg⁻¹ de peso seco del tejido .hr⁻¹ de incubación. Estos valores de bioensayo fueron además corregidos por las pérdidas de actividad en los pasos de extracción y cromatografía determinadas en un ensayo de recuperación paralelo. Las recuperaciones oscilaron entre un 40 y un 50%.

Las muestras experimentales y sus controles fueron siempre analizados en la misma preparación.

b) Determinación de PG tipo I₂

Para la determinación biológica de la actividad tipo prostaciclina uterina se incubaron trozos del órgano 20 minutos a temperatura ambiente en 200 ul. de solución KRB libre de Ca^{2+} . Finalizada la incubación, 50 ul del medio nutriente fueron transferidos a la cubeta de un agregómetro Payton que contenía plasma humano rico en plaquetas (prp). El prp fue obtenido por centrifugación durante 10 minutos a 200 x g de la sangre de donantes que no hubieran ingerido ácido acetil salicílico durante la semana anterior a la venopunción.

Luego de 45 minutos se introdujo en la cubeta 5uM de ADP como agente agregante de las plaquetas. La magnitud de la agregación se determinó por el grado de transmitancia lumínica a través de la muestra empleando el agregómetro. La inhibición del fenómeno fue determinada por comparación con la acción antiagregante de prostaciclina auténtica disuelta en buffer Tris 0.005 M pH 9.3. Con este fin se realizaron curvas de calibración dosis respuesta para acción antiagregante de prostaciclina para cada prp utilizado.

La actividad tipo prostaciclina generada por la muestra tisular fue cuantificada sobre la base de la curva de calibración y fue expresada en $\text{pg} \cdot \text{mg}^{-1}$ de peso del tejido seco.

2.2.2 Determinación de la K_d y N° de sitios de unión específicos para dihidroalprenolol (DHA) 3H

Las determinaciones se llevaron a cabo en preparaciones de membrana uterinas. Se utilizó exclusivamente la porción miometral del cuerno uterino, mientras que el endometrio fue separado por raspaje.

Los úteros libres de endometrio fueron seccionados en trozos pequeños y homogeneizados con un homogenizador Ultraturax en buffer Tris-ClH 0.01 M pH 7.4 en presencia de sacarosa 0.25 M. El homogenato se centrifugó 15 min a 3000 rpm y el sobrenadante obtenido fue sometido a una centrifugación de 90 min a 15.000 rpm. El "pellet" resultante, fue resuspendido en buffer Tris-ClH 0.075 M pH 7.4 con Cl_2Mg 0.025 M.

La concentración proteica de esta fracción particulada fue estimada por el método de cuantificación de proteínas de Lowry (165).

Para la determinación de la constante de equilibrio de asociación y número aparente de sitios de unión específicos se emplearon las técnicas usuales (269) que consisten en la incubación de varias concentraciones de radioligando con una concentración fija de tejido; la medición de ligando unido al mismo y el análisis de los datos de acuerdo con la ecuación de Scatchard (224)

La ecuación de Scatchard representa una relación lineal entre sus términos y está basada en la cinética de tipo Michaelis-Menten que exponen generalmente las interacciones receptor-ligando.

$$\frac{B}{F} = \frac{B_{\max} - B}{K_d}$$

donde:

B= concentración de ligando unido

B_{max}= número total de sitios de unión

F= concentración de ligando libre

Esta técnica permite, conociendo en el equilibrio la concentración de ligando unido y libre, estimar la constante de equilibrio de asociación K_a ó su inversa K_d y el número de sitios de unión.

Para ello, se incubaron las preparaciones de membranas uterinas con el radioligando (-) dihidroalprenolol (-DHA) ³H Actividad específica 90 Ci/mmol, siguiendo el procedimiento de Krall (144) utilizado para la identificación de adrenorreceptores beta en miometrio de rata. Las alícuotas del homogenato de 200 ul (100-200)µg. proteína, fueron incubadas por triplicado con distintas concentraciones de DHA ³H (0.4-16) nM, en presencia o ausencia de propranolol (1µM), antagonista de adrenorreceptores beta, como competidor del radioligando. Las alícuotas fueron llevadas a un volumen final de 250 ul con buffer de incubación: Tris-ClH pH 7.4 0.05 M Cl₂Mg 0.01 M.

Estas preparaciones se incubaron por 15 min a 23 C. A esta temperatura, dicho tiempo es suficiente para que la unión del ligando DHA a los adrenorreceptores beta del miometrio de rata alcance el equilibrio (144). Cumplido ese tiempo, se procedió a terminar la reacción con el agregado de 10 volúmenes de buffer frío Tris ClH 0.01M pH 7.4

La separación del radioligando libre del unido se efectuó por filtración a través de papel de filtro de vidrio Whatman GF/C, bajo vacío parcial. Este procedimiento permite retener al radioligando unido a membrana en el papel y eliminar el excedente no fijado a la fracción particulada.

En cada experimento se incluyó una serie paralela de mezclas de reacción sin tejido para evaluar la proporción del radioligando libre unido inespecíficamente al papel de filtro.

Los papeles de filtro fueron luego secados y ubicados en sendos viales de centelleo y su radiactividad fue cuantificada por espectrometría de centelleo líquido, previo agregado de líquido de centrilleo: 40g PPO; 50mg POPOP; 1 litro de tolueno.

La diferencia entre la concentración de radioligando unido, en presencia o ausencia del competidor, fue considerada una estimación del ligando combinado específicamente a los adrenorreceptores beta.

Con los valores de B y de $\frac{B}{F}$ para cada concentración del radioligando usado, se estimó, por regresión lineal aplicando la ecuación de Scatchard, la Kd y el Bmax ó número total de sitios de unión específicos.

2.23 Medición de la captación de norepinefrina (NE ^3H) tritiada

Las mediciones se realizaron sobre la base de la técnica empleada por Boyle y col. en el útero de rata (37). Los experimentos se realizaron in vitro empleando cuernos uterinos aislados de ratas adultas cuyo peso oscilaba entre 180 y 250 g. Los úteros fueron separados del animal e inmediatamente colocados en una caja de Petri ubicada en una cubeta con hielo y conteniendo solución KRB burbujeada con carbógeno. Ambos cuernos fueron allí abiertos longitudinalmente siguiendo la línea del mesometrio. Se los fraccionó en trozos equivalentes y se determinaron sus pesos húmedos.

Las fracciones fueron preincubadas 30 min. a 37 C en tubos de ensayo conteniendo 2ml de solución KRB a la cual se le había agregado EDTA (2ug/ml) y ácido ascórbico (20ug/ml), para reducir la oxidación de la catecolamina. Esta solución fue gaseada continuamente con carbógeno a lo largo de todo el experimento. Cumplido el tiempo de preincubación, se transfirieron los tejidos a tubos de ensayo conteniendo 2 ml de medio fresco. Se agregó a cada tubo 2.5 uCi de ^3H -(1)NE (AE: 10.4 Ci/mmol) diluída con NE fría hasta una concentración de 10^{-6}M . e inulina ^{14}C carboxyl 100 uM AE: 1-3 mCi/g para determinar el volumen del espacio extracelular de cada preparación con el fin de descontar la radiactividad de ^3H NE allí acumulada.

Se incluyó en todos los tubos, U0521 (10^{-4}M) y pargylina $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$.

para inhibir la acción de las enzimas metabolizantes de la NE, CCMT y MAO respectivamente.

De acuerdo con el protocolo experimental, 20 min antes de iniciar la incubación, se agregó a las preparaciones algunas de las siguientes drogas: cocaína (10^{-5} M), como bloqueante de la recaptación neuronal; ácido acetil salicílico (10^{-4} M) para inhibir la síntesis de prostaglandinas ó corticosterona ($5 \cdot 10^{-5}$ M) como bloqueante de la recaptación extraneuronal. Este último fue disuelto en etanol, siendo la proporción final del mismo en cada preparación de 0.5 ul/ml. Una cantidad equivalente fue incluida también en un grupo control con el fin de descartar un efecto tóxico.

Finalizado el período de incubación, se transfirieron inmediatamente las porciones tisulares a tubos con medio KRB frío con el objeto de frenar la reacción y se sometieron a tres lavados de 10 seg con medio frío. Así mismo, se colectaron muestras de 100 ul de los medios de incubación y se ubicaron en viales de centelleo para la determinación de ^3H y ^{14}C y posterior cálculo del volumen del espacio extracelular.

Posteriormente cada segmento fue sometido a digestión tisular con 1 ml de protosol curante 48 hs en estufa a 40 C. Se tomaron luego 100 ul de cada preparación solubilizada y se ubicaron en viales conteniendo el líquido de centelleo. La radioactividad de los mismos, ^3H y ^{14}C , fue determinada en un contador de centelleo líquido.

La magnitud de la acumulación tisular de ^3H NE, obtenida en el conteo como cuentas por minuto (cpm), previo descuento de las cpm provenientes del espacio extracelular, fue transformada a nmoles.g^{-1} de tejido.

2.3 Método estadístico

Para la evaluación estadística de los datos se utilizó la prueba de hipótesis de Student de las diferencias entre dos medias ("test" de \underline{t}) .

Para estimar la asociación entre dos variables, se calculó el coeficiente de correlación lineal (r) (237).

En los casos en que fue menester comparar más de dos medias simultáneamente, se aplicó el Análisis de Varianza de 1 ó 2 factores, efectuándose las comparaciones mediante el test de Tukey.

CAPITULO III

RESULTADOS

1. Participación de las PGs en la motilidad uterina

Se han señalado en el capítulo introductorio la existencia de diversos estudios que ponen de manifiesto la capacidad del útero para sintetizar PGs, como así también la de otras investigaciones que destacan la habilidad de las PGs exógenas para desencadenar respuestas contráctiles. Debe notarse, sin embargo, que son limitados los estudios destinados a explorar la participación de las PGs en la motilidad uterina. Con este propósito, se decidió examinar la influencia de las PGs endógenas en la motilidad espontánea in vitro del útero de ratas intactas, en cada uno de los varios estadios del ciclo sexual.

1.1 Producción de PGs tipo E y F por cuernos uterinos aislados de ratas en distintos estadios del ciclo sexual

El objetivo de la primera serie de experimentos fue determinar las PGs generadas "in vitro" por el útero de ratas en diferentes estadios de su ciclo.

Las PGs en la solución KRB se determinaron luego de 60 min de actividad contráctil, después del aislamiento del útero.

La figura 24 muestra la cantidad de PG tipo E y F, liberadas al medio de incubación desde los cuernos uterinos de animales en proestro, estro, metaestro y diestro.

La liberación de PG tipo E por el útero de ratas en estro fue significativamente más baja que en el metaestro y el diestro ($p < 0.001$) y de igual magnitud que en el proestro.

La PG tipo F liberadas por el útero de animales en estro fue significativamente mayor que en el proestro y el metaestro ($p < 0.01$) y de igual magnitud que en diestro.

1.2 Producción de PG tipo I_2 por segmentos uterinos "in vitro"

La tabla 1 presenta los resultados de las mediciones de la actividad antiagregante tipo prostaciclina en el medio de incubación de segmentos uterinos aislados de ratas en las distintas fases del ciclo estral.

La liberación de PG tipo I_2 fue similar en todos los estadíos estudiados excepto el diestro donde los niveles generados fueron significativamente mayores.

1.3 Caracterización de la motilidad espontánea del útero aislado de ratas en los distintos estadíos del ciclo sexual

Con el fin de examinar el comportamiento contráctil del úte-

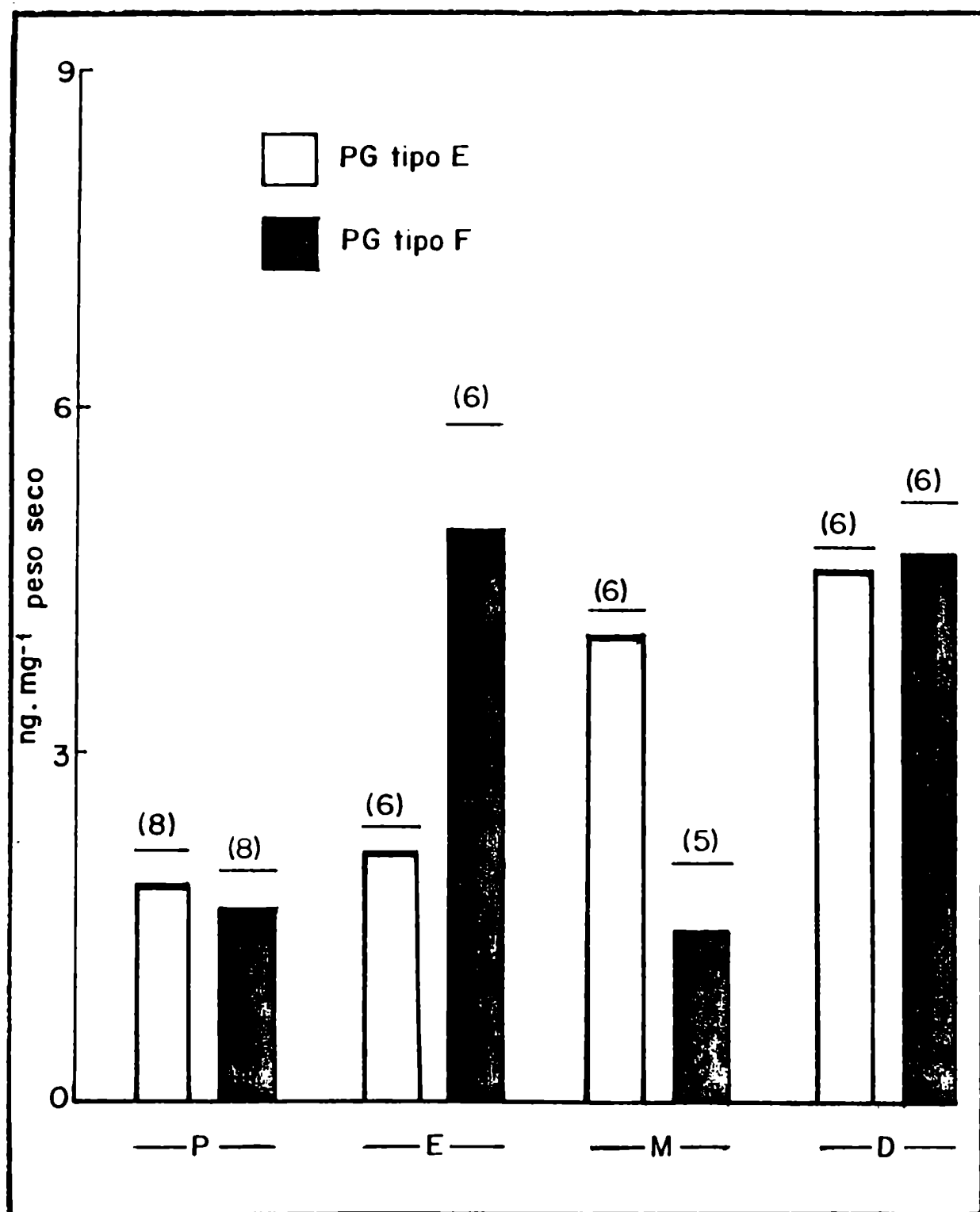


Fig. 24: PGs de tipo E y F liberadas al medio de incubación por cuernos uterinos de rata aislados en los distintos estadios del ciclo sexual

Los datos se expresan en ng.mg^{-1} de tejido seco como $\text{Media} \pm \text{ETM} (n)$

P=proestro E=estro M=metaestro D=diestro

ESTADIO DEL CICLO SEXUAL	MATERIAL TIPO PGI pg. mg ⁻¹ peso seco
PROESTRO	135 ± 22 (6)
ESTRO	119 ± 20 (6)
METAESTRO	140 ± 23 (6)
DIESTRO	247 ± 50 (6) *

Tabla 1: Material de tipo I₂ liberado por el útero de rata aislado en diferentes estadios del ciclo sexual

Los datos se expresan en pg.mg⁻¹ peso seco como Media[±] ETM (n)

* Diestro vs. Metaestro: p<0.05

ro aislado de rata a lo largo del ciclo sexual se determinó la tensión y la frecuencia contráctiles de los ciclos correspondientes a los cuernos uterinos en los primeros 10 min post-aislamiento. Se exploró además la estabilidad de dichos parámetros a través del tiempo.

En la tabla 2 se exponen resumidamente los niveles de la tensión contráctil isométrica y de la frecuencia de las contracciones iniciales observadas durante los primeros 10 min que siguieron al aislamiento, referidas como tensión inicial y frecuencia inicial.

La tensión inicial de cuernos uterinos aislados de ratas en metaestro fue significativamente mayor ($p < 0.02$) que la observada en estro o proestro, pero no difirió de la del diestro.

A través del ciclo sexual, no se observaron diferencias significativas en la frecuencia contráctil inicial.

En la figura 25 y 26 se analizan las variaciones durante 60 min de actividad "in vitro" de la tensión contráctil isométrica (TCI) y la frecuencia contráctil (FC) cuantificadas en períodos de 10 min.

Los resultados se expresan como porcentaje de cambio con respecto de los 10 primeros minutos iniciales tomados como control de 100%.

Puede observarse que hay una caída progresiva de la TCI a través del tiempo, siendo la misma a los 60 min. mayor en

ESTADIO DEL CICLO SEXUAL	TENSION (mg.mg ⁻¹ peso seco)	INICIAL	FRECUENCIA INICIAL (contracciones . 10 min ⁻¹)
PROESTRO	30 ± 7	(8)	9 ± 1.3 (8)
ESTRO	28 ± 6	(9)	9 ± 2 (9)
METAESTRO	51 ± 6	(8)	10 ± 2.9 (8)
DIESTRO	48 ± 4	(10)	11 ± 1.6 (10)

Tabla 2: Tensión contráctil isométrica inicial (TCI) y frecuencia contráctil inicial (FC) de cuernos uterinos de rata aislados en diferentes estadios del ciclo sexual.

Los datos se expresan en mg.mg⁻¹ peso seco y N° contracciones/10 min. como Media ±ETM;(n)

estro y proestro que en metaestro y diestro $p < 0.001$.

El útero en diestro se caracterizó por una FC constante a lo largo del tiempo de experimentación. La variación de la FC en metaestro, al cabo de 60 min fue mayor, $p < 0.003$, y en estro y proestro, se observó una disminución marcada de este parámetro contráctil, $p < 0.001$.

1.4 Efecto de inhibidores de síntesis de PGs sobre la motilidad espontánea del útero de rata aislado en distintos estadios del ciclo sexual

El objetivo de esta serie de experimentos fue determinar si la inhibición "in vitro" de la síntesis endógena de PGs afecta la motilidad espontánea del útero aislado de rata.

Los gráficos de las figuras (27) y (28) resumen el efecto de la indometacina y del ácido acetil salicílico sobre la constancia de la TCI y la FC de los cuernos uterinos de rata aislados en los cuatro estadios del ciclo sexual.

Se observó que ambos inhibidores disminuyen significativamente la TCI y la FC solamente en aquellos estadios caracterizados por presentar gran estabilidad en ambos parámetros contráctiles a través del tiempo: metaestro y diestro. Por el contrario, en estro y proestro, donde existe espontáneamente caída significativa de dichas variables en relación con el tiem-

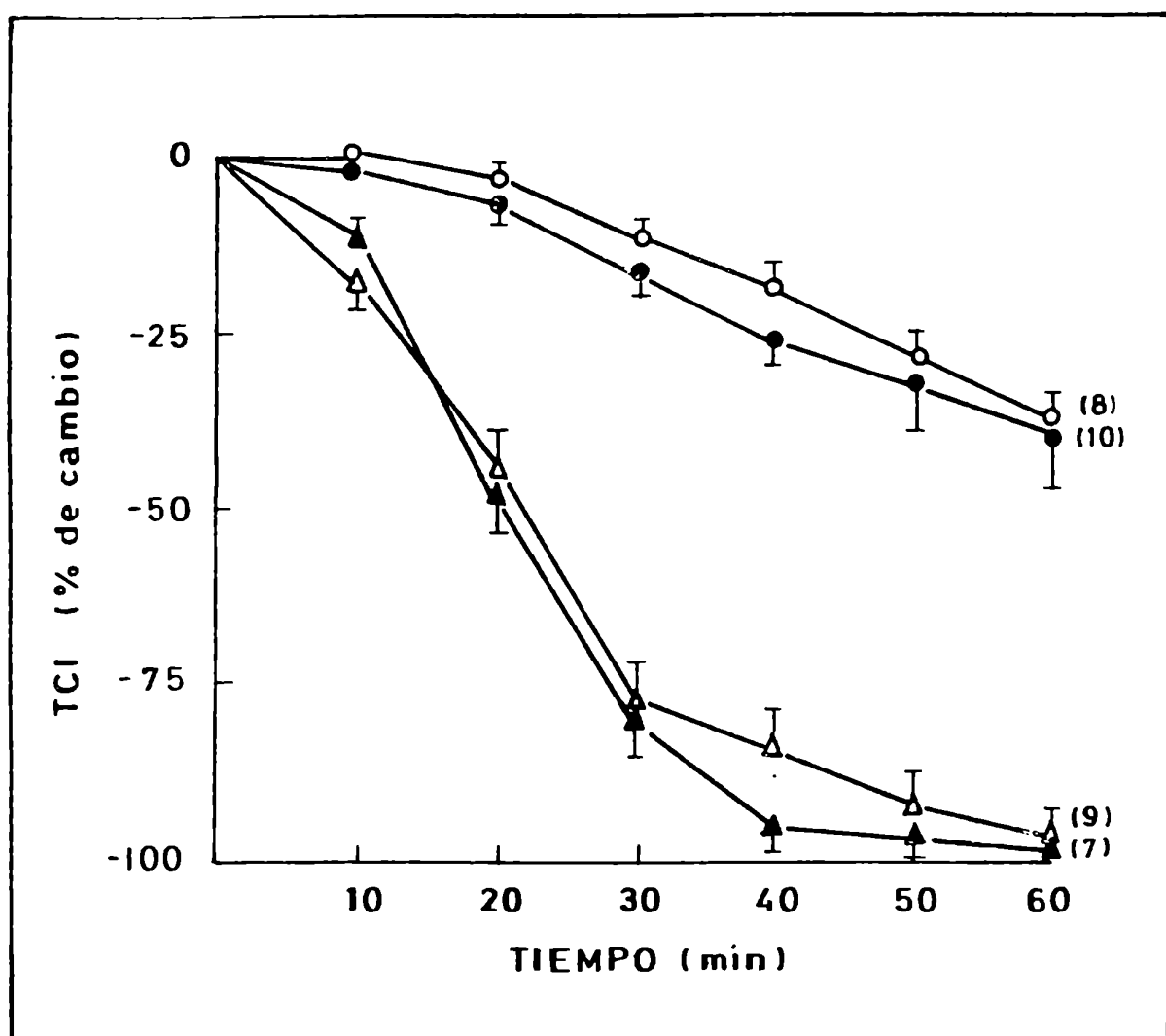


Fig. 25: Constancia de la TCI desarrollada por cuernos uterinos de rata aislados en diferentes estadios del ciclo sexual

Los datos se expresan en % de cambio con respecto de la TCI control en $\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$ peso seco como $\text{Media} \pm \text{ETM}; (n)$

▲ proestro △ estrus ● metaestro ○ diestro

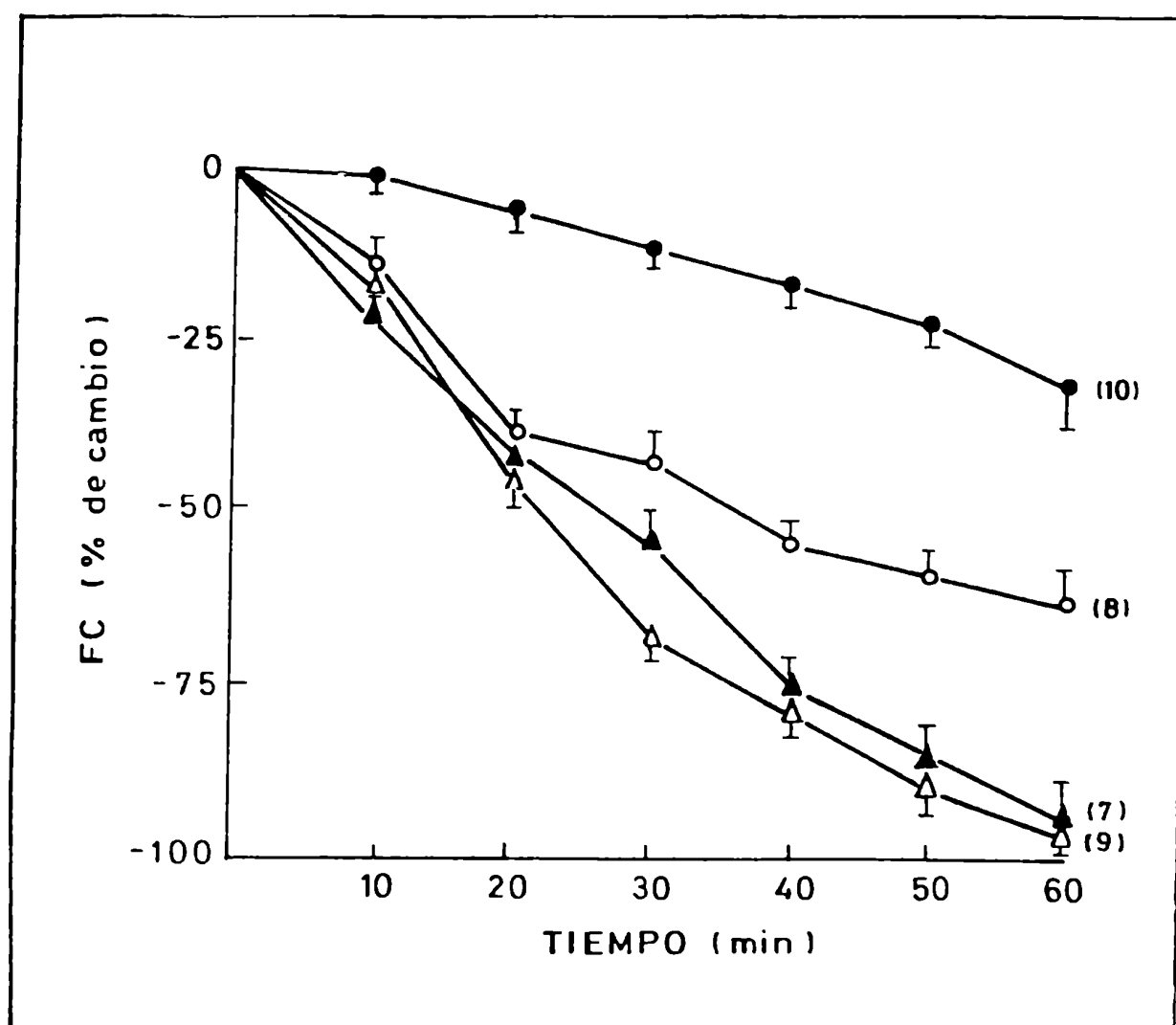


Fig. 26: Constancia de la FC desarrollada por cuernos uterinos de rata aislados en diferentes estadios del ciclo sexual

Los datos se expresan como % de cambio de la FC control en contracciones. 10 min^{-1} como $\text{Media} \pm \text{ETM}; (n)$

▲ proestro △ aestro ○ metaestro ● diestro

po de dichas variables, ninguno de los dos bloqueantes modificó sensiblemente ni la frecuencia ni la magnitud de la tensión.

1.5 Acción de PGs exógenas sobre la motilidad uterina

Con el objeto de analizar la acción de PGs exógenas sobre las contracciones uterinas, se construyeron curvas dosis respuesta de tipo acumulativo para PGE_2 y PGF_2 alfa en preparaciones uterinas aisladas en los cuatro estadios del ciclo sexual. Para ello se evaluó la tensión contráctil isométrica desarrollada por los cuernos uterinos (tratados con ácido acetil salicílico para evitar la participación de PGs endógenas) frente al agregado de concentraciones crecientes de PGs (10^{-10} - 10^{-4})M. Posteriormente, a partir de las curvas construídas, se calculó la concentración efectiva de PG que ejercía un 50% de estimulación (EC_{50}).

El resumen de estas estimaciones se muestra en la Tabla 3. Puede observarse que el EC_{50} para las PGs estudiadas, no varía significativamente en los distintos estadios. Si bien los valores de EC_{50} obtenidos para PGE_2 son más bajos que para PGF_2 alfa, indicando una mayor potencia estimulante para PGE_2 , el análisis de la comparación estadística de esos datos, no evidenció diferencias significativas.

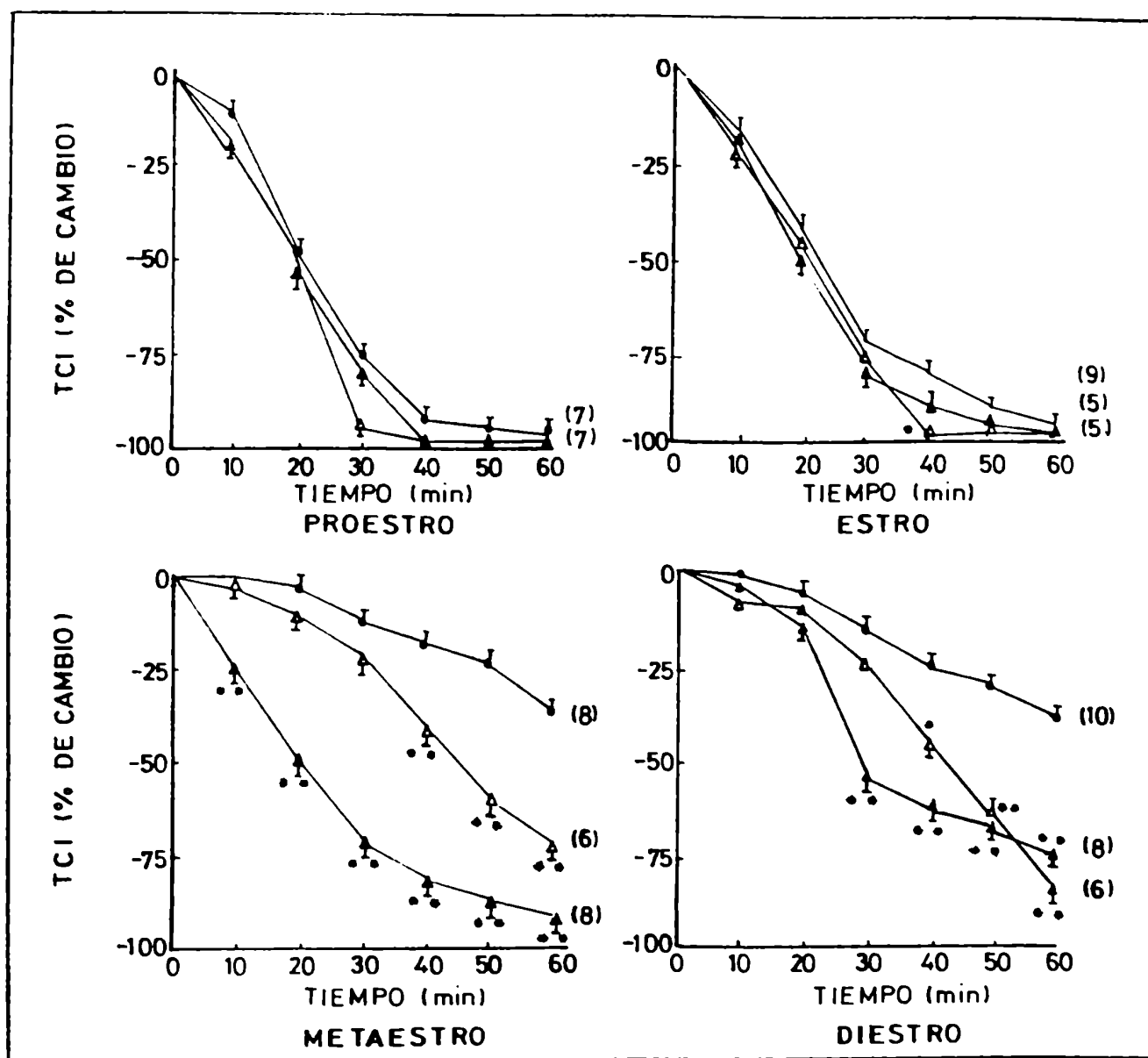


Fig. 27: Efecto de inhibidores de síntesis de PGs sobre la constancia de la TCI desarrollada por cuernos uterinos de rata aislados en diferentes estadios del ciclo sexual.

Los datos se expresan como % de cambio de la TCI inicial en mg.mg^{-1} peso seco como Media \pm ETM; (n)

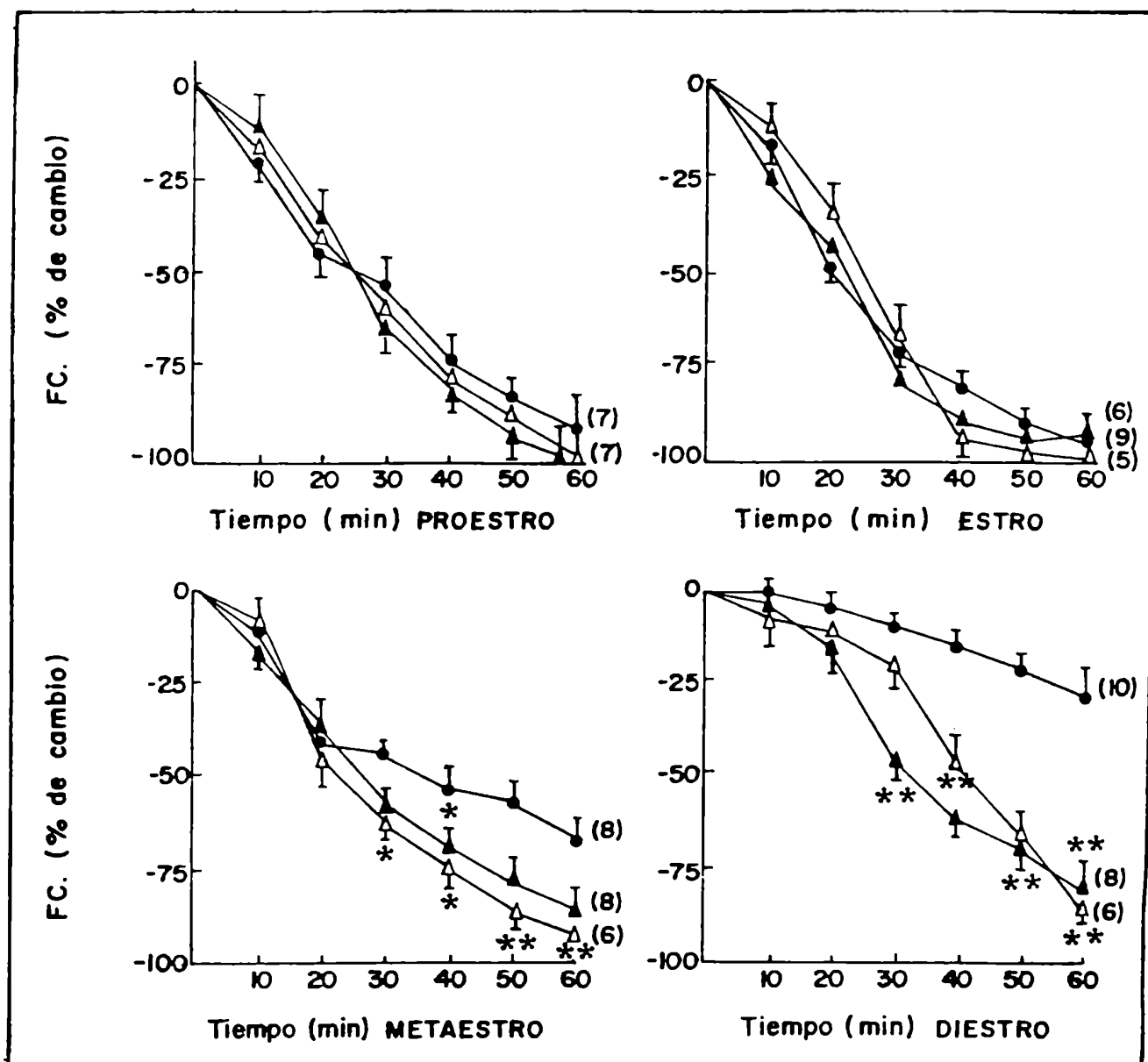
● control

▲ Indometacina. Se agregó a tiempo 0. Concentración final 10^{-6} M

△ Acido acetil salicílico. Se agregó a tiempo 0. concentración final 10^{-4} M

* tratado vs. control $p < 0.01$

** tratado vs. control $p < 0.001$



ESTADIO DEL CICLO ESTRAL	PGE ₂	PGF ₂ α
PROESTRO	1.02 \pm 0.9 (10 ⁻⁷ M) (n = 6)	3.46 \pm 1.3 (10 ⁻⁷ M) (n = 5)
ESTRO	8.60 \pm 1.0 (10 ⁻⁸ M) (n = 5)	3.82 \pm 1.8 (10 ⁻⁷ M) (n = 5)
METAESTRO	8.46 \pm 1.3 (10 ⁻⁸ M) (n = 5)	5.01 \pm 2.1 (10 ⁻⁷ M) (n = 5)
DIESTRO	8.44 \pm 1.3 (10 ⁻⁸ M) (n = 5)	4.35 \pm 1.8 (10 ⁻⁷ M) (n = 4)

Tabla 3: Concentración molar efectiva para 50% de estimulación máxima por PGE₂ y PGF₂ alfa en el útero de rata aislado en distintos estadios del ciclo sexual.

Los datos se expresan en concentración molar (M) como Media[±]ETM; (n)

1.6 Correlación entre liberación de PGs y motilidad uterina

Teniendo en cuenta la capacidad de las PGs exógenas para ejercer un inotropismo positivo sobre los cuernos uterinos, tal como se señala en la sección 1.5 y considerando la dependencia de la actividad espontánea del útero aislado por las PGs endógenas, demostrada en la sección 1.4, se decidió establecer mediante coeficientes de correlación (calculados por análisis de regresión lineal) el grado de interrelación entre la motilidad espontánea que presenta el útero de rata aislado en cada estadio del ciclo sexual y las distintas PGs producidas simultáneamente por el mismo.

En la figura 29 se observa que la estabilidad de la tensión contráctil isométrica y de la frecuencia contráctil de los cuernos uterinos de rata aislados en cada uno de los estadios del ciclo sexual, evaluadas luego de 60 min de actividad "in vitro", se correlacionan con los niveles de PG tipo E generados por las preparaciones ($r=0.97$ y $r=0.94$) pero no lo hacen con la PG tipo F ($r=0.03$) y $r=0.16$)

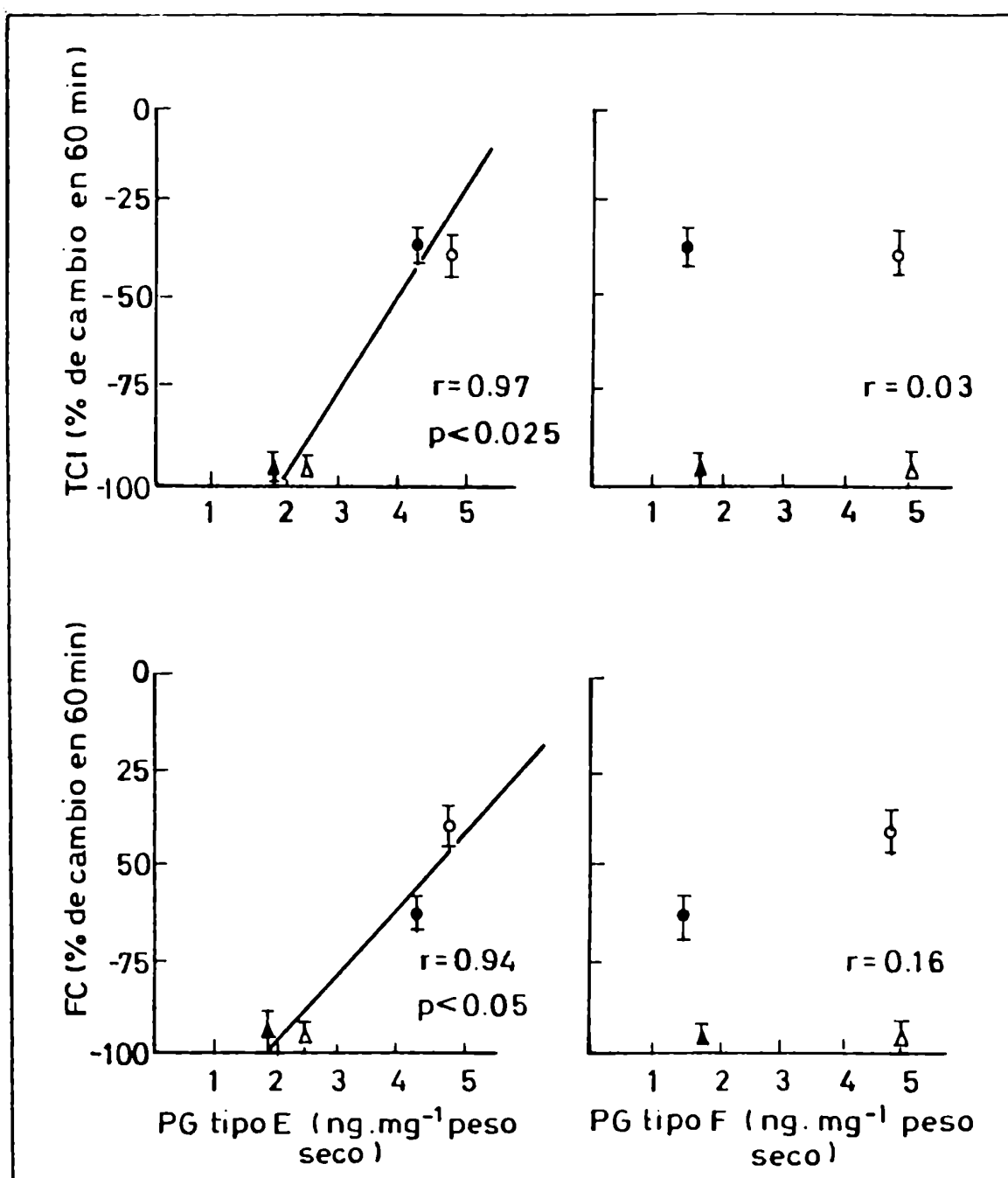


Fig. 29: Correlación entre la TCI y FC desarrolladas por cuernos uterinos de rata aislados en los distintos estadios del ciclo sexual y los niveles de PGE y PGF generados simultáneamente

▲ proestro △ estrus ● metestro ○ diestro

r = coeficiente de correlación

2. Influencia de hormonas sexuales en la motilidad y liberación de PGs

En las secciones precedentes, se señaló que en los estadios del ciclo sexual sujetos a una marcada influencia estrogénica (proestro y estro), el útero presentaba una motilidad escasa, hecho que se correlacionó con una baja producción de PGE por el mismo. Opuestamente, en el metaestro y el diestro, la buena actividad contráctil coincidió con altos niveles de síntesis y liberación de PGE. Con el fin de obtener información adicional referida a la influencia hormonal sobre dichas variables, se seleccionó como modelo experimental de los estudios siguientes, el útero aislado de ratas inmaduras (25 días de edad). Tal como se señaló en la introducción, este tipo de tejido se halla afectado por una baja concentración de hormonas sexuales.

2.1 Producción de PGs tipo E y F por cuernos uterinos aislados de ratas inmaduras. Efecto de estradiol y progesterona

Los cuernos uterinos aislados de ratas de 25 días generaron y liberaron al medio de incubación, luego de 60 min de actividad contráctil "in vitro", más PG de tipo E que de tipo F (Fig. 30)

La producción de PG tipo E por el útero de animales tratados con 17-beta estradiol fue significativamente menor que la control, mientras que los niveles de producción de PG de tipo F fueron similares a los de los controles.

Las preparaciones uterinas obtenidas de animales inyectados con progesterona, liberaron al medio de incubación mayores cantidades de PG de tipo F, pero los niveles de PGE fueron similares a los producidos por los animales control.

2.2 Caracterización de la motilidad espontánea de cuernos uterinos aislados de ratas inmaduras

Efecto de estradiol y progesterona

La figura (31) muestra los niveles de tensión inicial desarrollados por el útero aislado de rata inmadura sometida a distintos tratamientos hormonales en los 10 minutos después de su aislamiento.

Se puede observar que la tensión inicial fue significativamente mayor en los grupos tratados que el control.

No se detectaron diferencias significativas entre los grupos con respecto de la frecuencia inicial postaislamiento (Fig. 32).

Se estudió la constancia de la tensión contráctil desarrollada por los cuernos uterinos durante 60 min de actividad "in vitro" (Fig. 33)

Todos los grupos presentaron gran estabilidad de la TCI a través del tiempo, excepto las preparaciones uterinas aisladas

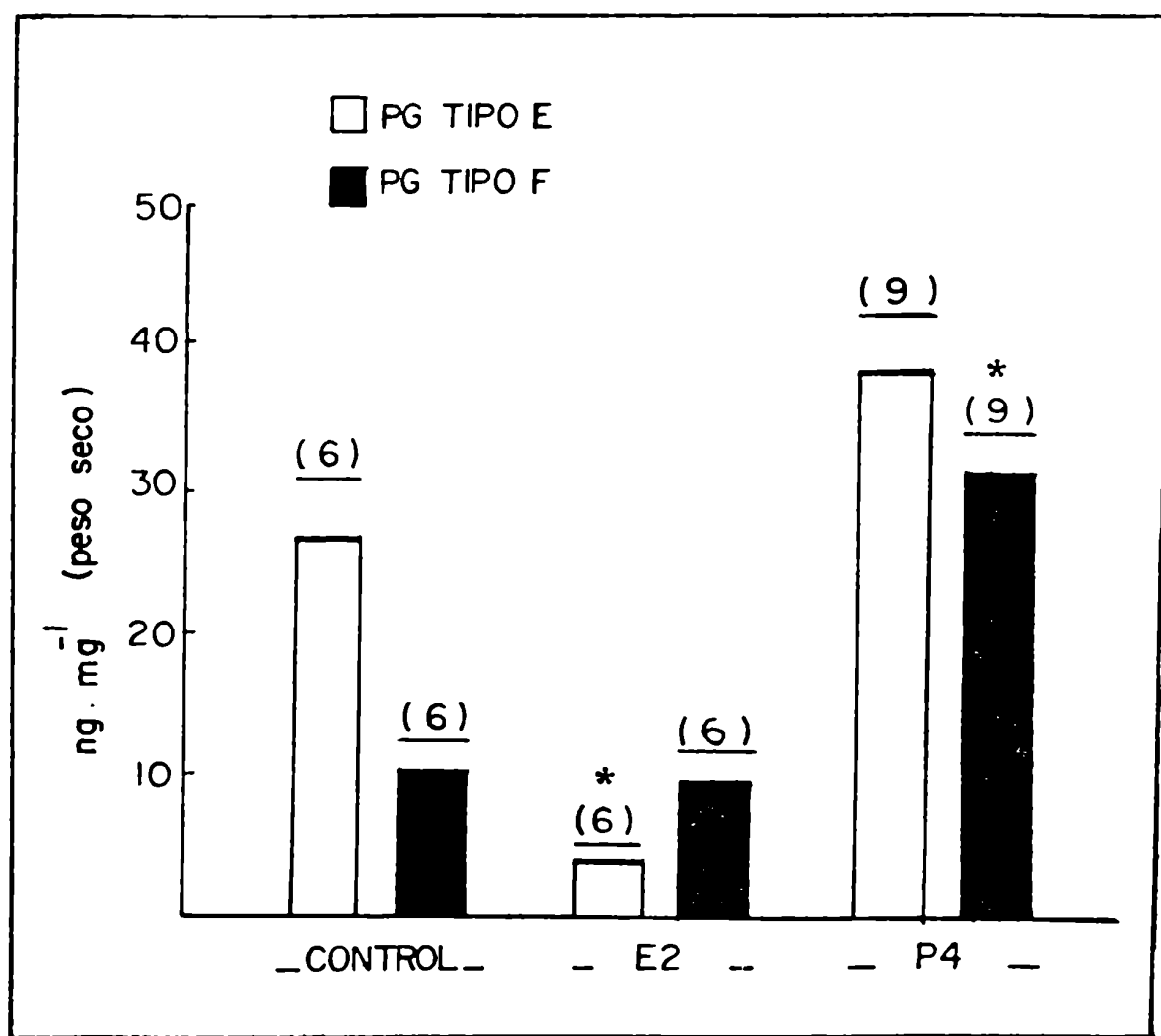


Fig. 30: Prostaglandinas de tipo E y F liberadas al medio de incubación por cuernos uterinos de ratas inmaduras de 25 días

E₂ = grupo inyectado con 17-beta estradiol

P₄ = grupo inyectado con progesterona

Los datos se expresan en ng.mg peso seco⁻¹ como Media[±] ETM; (n)

* tratado vs. control p < 0.01

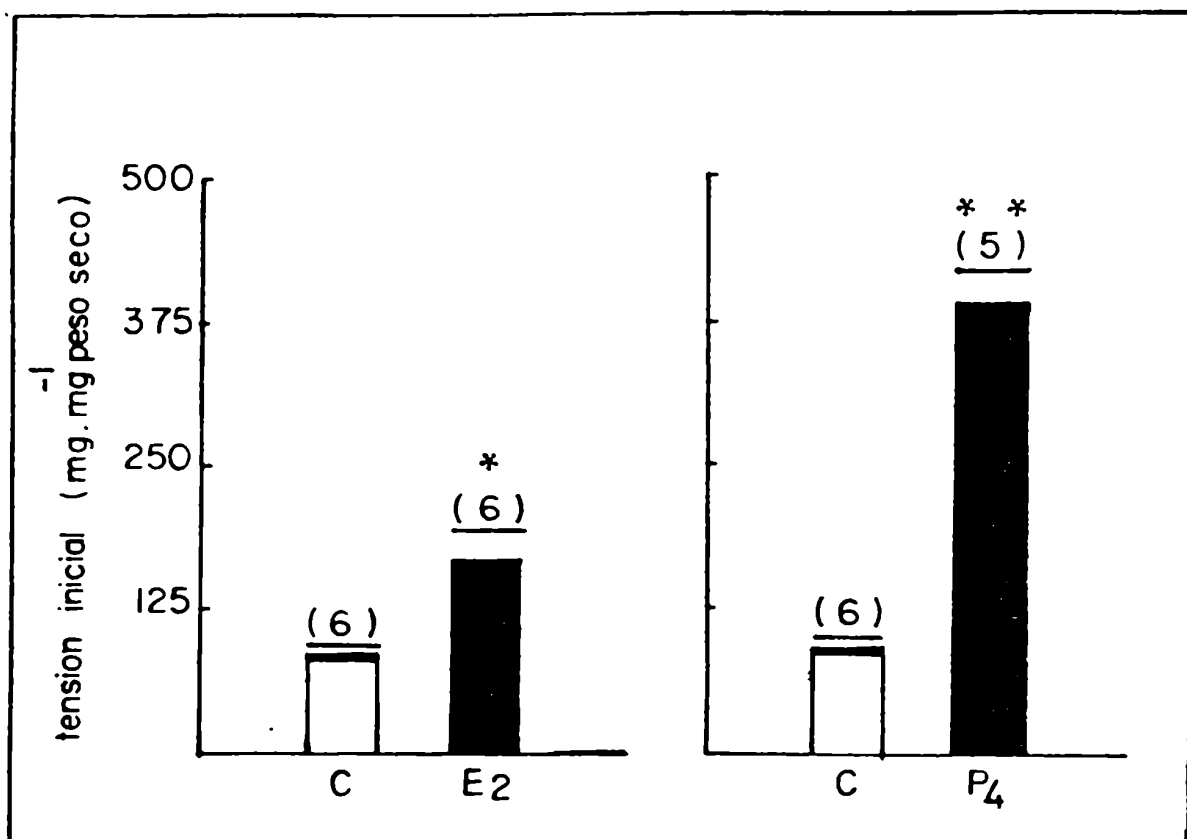


Fig. 31: Tensión contráctil inicial desarrollada por cuernos uterinos aislados de ratas inmaduras de 25 días
Efecto de estradiol y progesterona

Los datos se expresan en $\text{mg.mg peso seco}^{-1}$ como $\text{Media} \pm \text{ETM}; (n)$

* tratado vs. control $p < 0.01$

** tratado vs. control $p < 0.001$

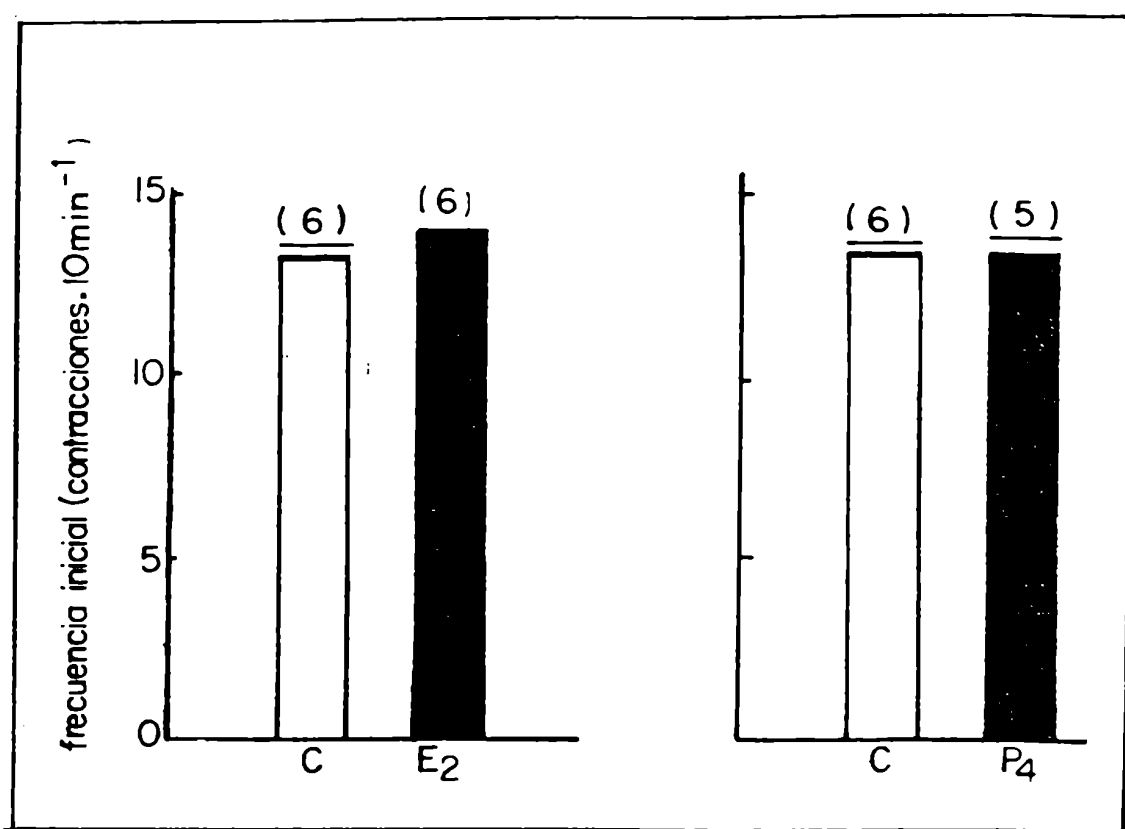


Fig. 32: Frecuencia inicial desarrollada por cuernos uterinos de ratas inmaduras de 25 días.

Efecto de estradiol y progesterona

Los datos se expresan en N°contracciones. 10min⁻¹
como Media[±] ETM; (n)

de ratas inyectadas con estradiol, las cuales a los 60 min mostraron una disminución significativa de su TCI.

La constancia de la FC desarrollada por los cuernos uterinos durante 60 min, también fue explorada (Fig. 34), comprobándose una reducción del 25% con respecto de la FC inicial, tanto en el grupo control, como en el estrogeneizado. La FC desarrollada por las preparaciones uterinas de ratas inyectadas con progesterona, no decayó sensiblemente luego de 60 min de actividad.

2.3 Efecto de inhibidores de síntesis de PGs sobre la motilidad espontánea del útero aislado de rata inmadura

El objetivo de esta serie de experimentos fue determinar si la inhibición "in vitro" de la síntesis endógena de PGs reduce la motilidad del útero aislado de ratas inmaduras de 25 días de edad.

En los gráficos de la figura 35 se observa que tanto la indometacina como el ácido acetil salicílico modifican significativamente la caída a través del tiempo de la tensión contráctil isométrica y de la frecuencia contráctil .

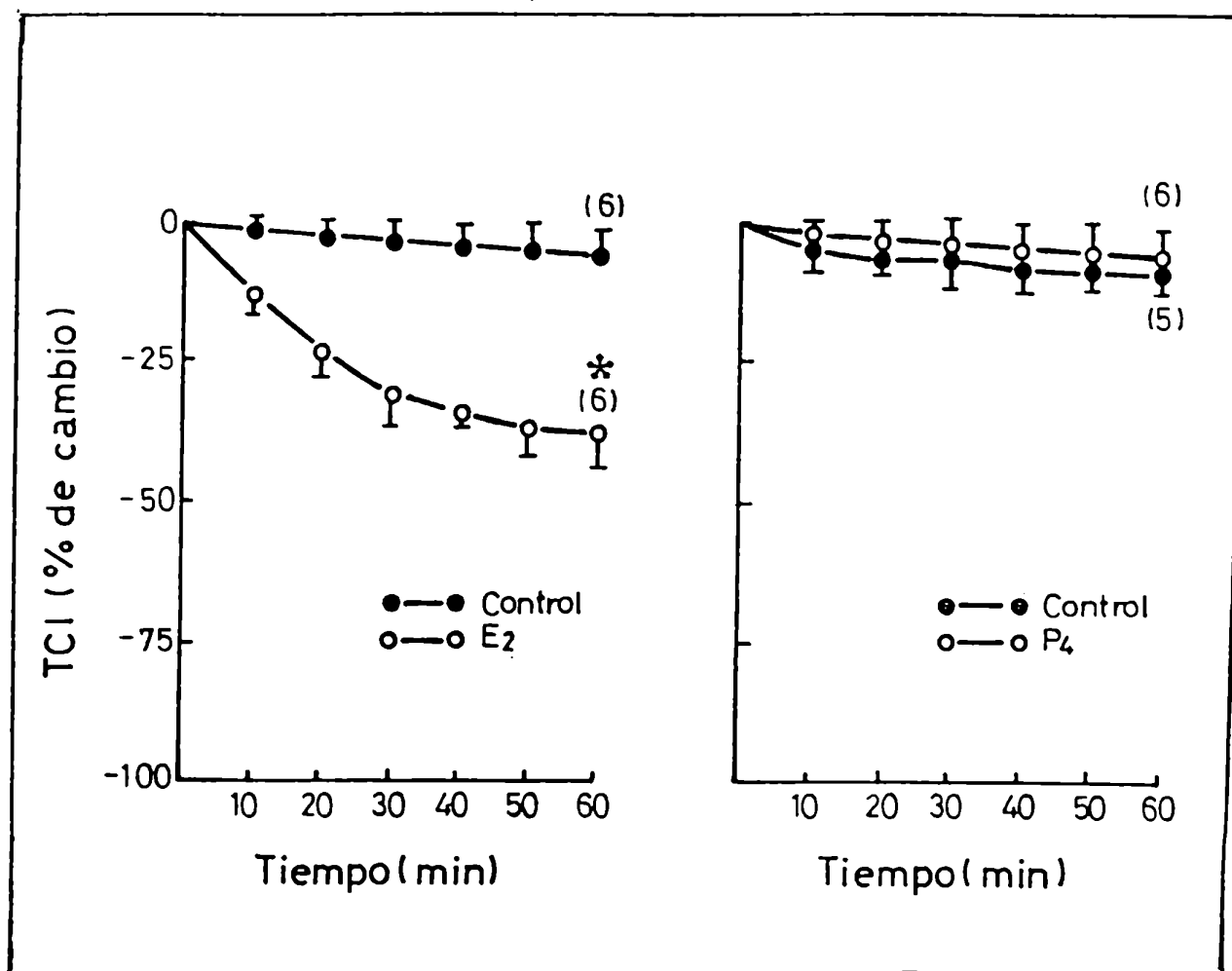


Fig. 33: Constancia de la TCI desarrollada por cuernos uterinos aislados de ratas inmaduras. Efecto de estradiol y progesterona.

Los datos se expresan como % de cambio con respecto de la TCI inicial en mg.mg peso seco⁻¹ como Media[±]ETM; (n)

* tratado vs. control $p < 0.01$

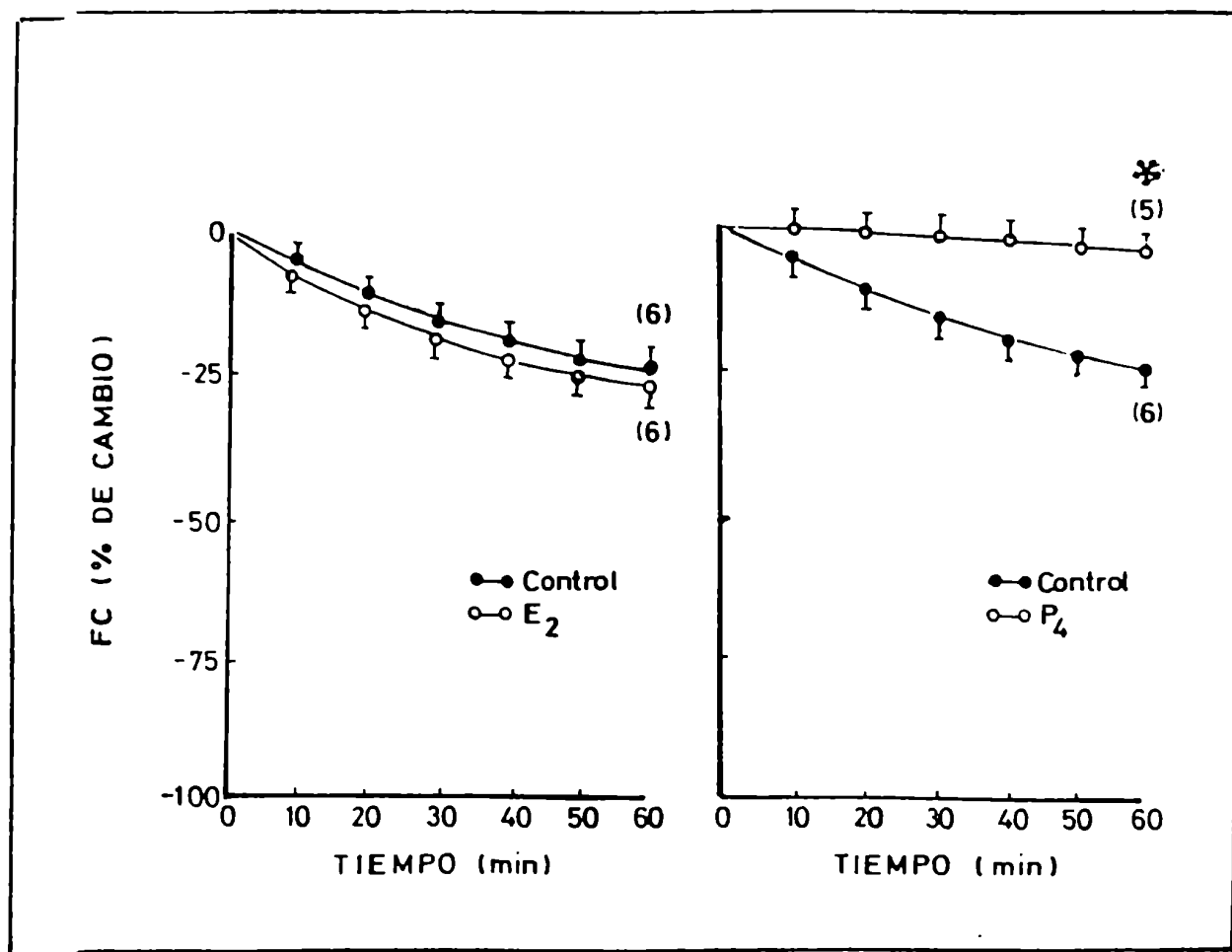


Fig. 34: Constancia de la FC desarrollada por cuernos uterinos aislados de ratas inmaduras de 25 días.

Efecto de estradiol y progesterona

Los datos se expresan como % de cambio con respecto de la FC inicial en N° contracciones. 10 min^{-1} como $\text{Media} \pm \text{ETM}; (n)$

* tratado vs. control $p < 0.01$

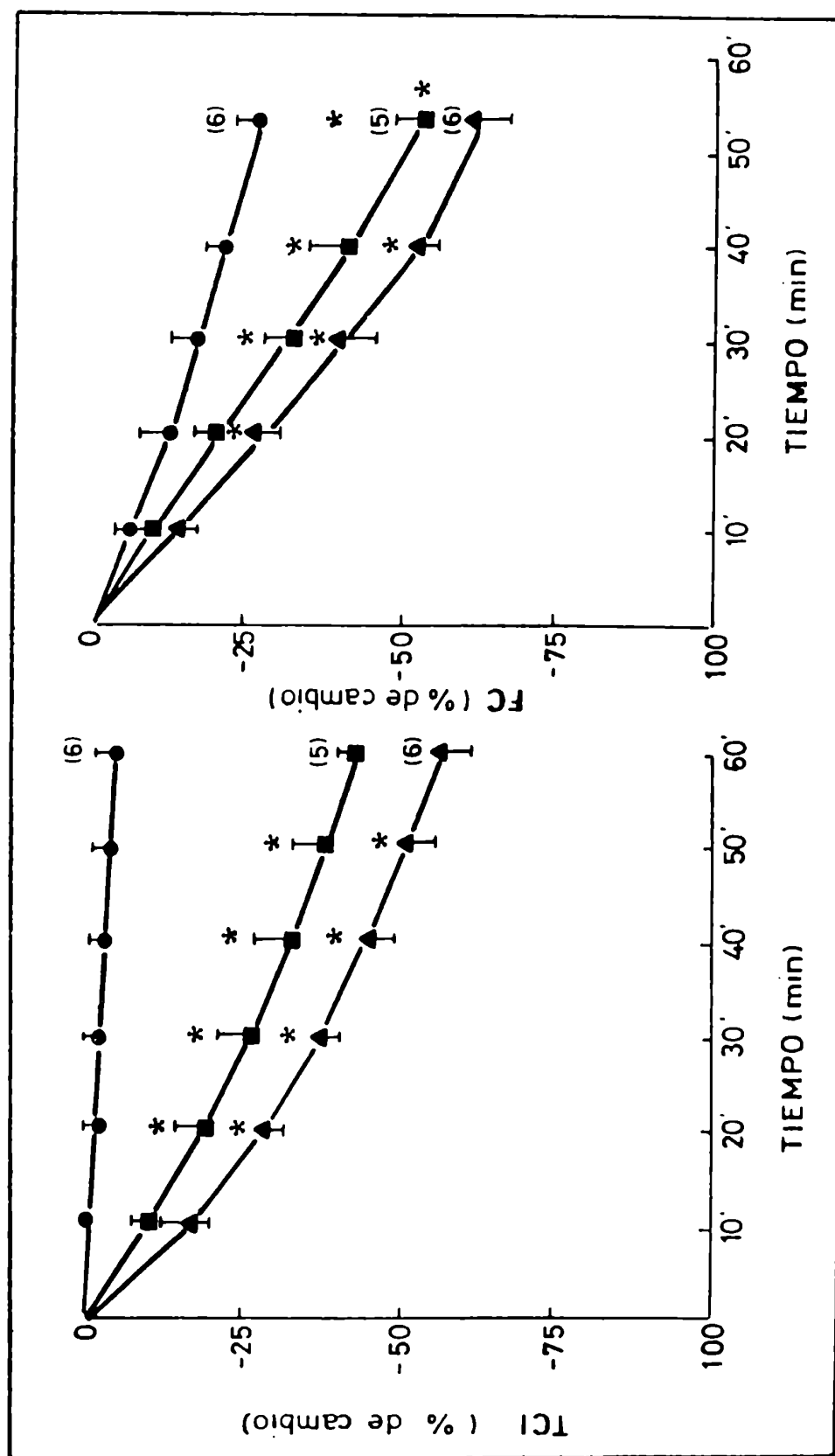


Fig. 35: Efecto de inhibidores de síntesis de PGs sobre la constancia de la TCI y la FC desarrollada por cuernos uterinos aislados de ratas inmaduras de 25 días

control

Indometacina. Agregado a tiempo 0. Concentración final $10^{-6}M$

Acido acético. Agregado a tiempo 0. Concentración final $10^{-4}M$

* tratado vs. control $p < 0.05$

3. Influencia de las PGs en la respuesta adrenérgica del útero aislado de rata

Se ha señalado en la introducción que las hormonas sexuales influyen varios aspectos relacionados con la actividad adrenérgica uterina. En vista de que estos esteroides inducen además modificaciones en la síntesis de PGs, se decidió investigar si las PGs ejercen influencia en la respuesta adrenérgica del útero aislado de rata.

3.1 Efecto de agonistas de adrenorreceptores sobre la motilidad espontánea de cuernos uterinos aislados de rata en diferentes estadios del ciclo sexual

Con el objeto de estudiar la respuesta del útero aislado de rata frente a ciertos agonistas de adrenorreceptores se construyeron curvas dosis respuesta de tipo acumulativo para norepinefrina (NE) (agonista natural) y para isoproterenol (ISO) (agonista beta) en cuernos uterinos aislados en los 4 estadios del ciclo sexual.

En la figura (36) se observa que tanto NE como el ISO inhibieron las contracciones espontáneas en las 4 condiciones estudiadas, si bien la influencia inhibitoria varió de acuerdo con el día del ciclo analizado. El orden de respuesta fué: estro=diestro>proestro>metaestro.

En metaestro, la NE no inhibió completamente las contraccio-

nes espontáneas ni aún a concentraciones tan elevadas como 10^{-3} M.

El antagonista de adrenorreceptores beta propranolol (10^{-6} M) anuló totalmente la acción depresora de la motilidad de ambos agonistas.

El orden de potencia de los agonistas beta fue ISO > NE en todas las condiciones estudiadas.

3.2 Correlación entre la acción beta adrenoceptiva de las catecolaminas y la liberación de PGs al medio de incubación

En la tabla 4 se resumen los valores correspondientes a las PGs de tipo E y F generadas por cuernos uterinos de rata aislados en diferentes estadios del ciclo estral.

A partir de las curvas dosis respuesta para NE e ISO (sección 3.1) se calcularon las concentraciones efectivas de ambos agonistas requeridas para ejercer un 50% de inhibición de las contracciones uterinas espontáneas (Tabla 5). En el estro, los valores de EC50 para NE e ISO son similares a los del diestro, pero difieren significativamente ($p < 0.01$) de los del proestro y metaestro.

La figura (37) muestra los gráficos de correlación entre producción de PGs y EC50 para agonistas de adrenorreceptores beta.

Se halló buena correlación entre la PG de tipo F generada

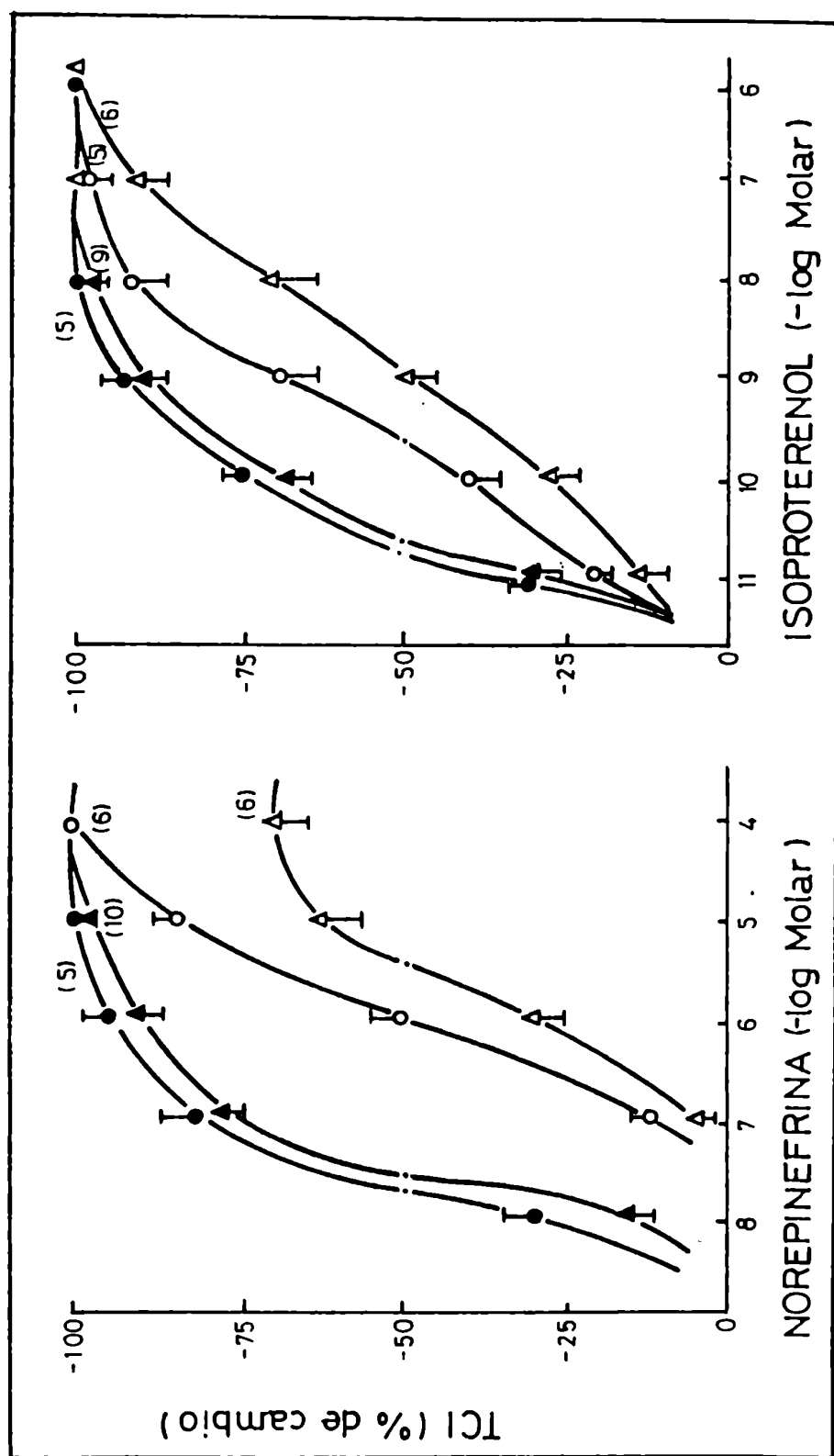


Fig. 36: Curvas dosis respuesta de tipo acumulativo para norepinefrina e isoproterenol en segmentos uterinos de rata aislados en distintos estadios del ciclo sexual

Los datos se expresan en % de cambio con respecto del control en $\text{mg} \cdot \text{mg peso seco}^{-1}$ como Media \pm ETM ; (n)

oestro ● ametaestro ▲ diestro ◆

ESTADIO DEL CICLO SEXUAL	PG Tipo F (ng. mg ⁻¹ peso seco)	PG Tipo E (ng. mg ⁻¹ peso seco)
PROESTRO	1.7 ± 0.3 (n=8)	1.9 ± 0.3 (n=8)
ESTRO	5.0 ± 0.9 (n=6)	2.4 ± 0.3 (n=6)
METAESTRO	1.5 ± 0.6 (n=5)	4.1 ± 0.2 (n=6)
DIESTRO	4.8 ± 0.2 (n=6)	4.7 ± 0.7 (n=6)

Tabla 4: PGs tipo E y F liberadas al medio de incubación por cuernos uterinos de rata aislados en diferentes estadios del ciclo sexual. Los datos se expresan como Media[±]ETM;(n)

ESTADIO DEL CICLO SEXUAL	NOREPINEFRINA (EC 50)	ISOPROTERENOL (EC 50)
PROESTRO	9.60 ± 1.0 (10 ⁻⁷ M) n=6	3.85 ± 1.1 (10 ⁻¹⁰ M) n=5
ESTRO	4.11 ± 1.9 (10 ⁻⁸ M) n=5	2.85 ± 0.9 (10 ⁻¹¹ M) n=5
METAESTRO	6.02 ± 1.8 (10 ⁻⁶ M) n=6	1.66 ± 0.3 (10 ⁻⁹ M) n=6
DIESTRO	4.45 ± 1.1 (10 ⁻⁸ M) n=10	3.94 ± 0.2 (10 ⁻¹¹ M) n=9

Tabla 5: Concentración molar efectiva para el 50% de inhibición(EC50) de las contracciones uterinas provocadas por norepinefrina e isoproterenol
Los datos se expresan como Media[±] ETM;(n)

por los cuernos uterinos aislados en proestro, estro, metaestro y diestro y la acción deprimidora de NE ($r=-0.94$) y de ISO ($r=-0.93$).

No se observó correlación entre la acción beta inhibitoria de las catecolaminas y la PG de tipo E liberada al medio de incubación en distintos estadios del ciclo sexual.

3.3 Efecto de concentraciones subumbrales de PGF y PGE sobre la respuesta del útero aislado de rata en metaestro a NE

La correlación positiva observada entre la PGF liberada al medio de incubación por cuernos uterinos aislados de ratas en proestro, estro, metaestro y diestro y la potencia inotrópica inhibitoria de NE e ISO sobre segmentos uterinos, permite sugerir la hipótesis de que el efecto de las catecolaminas actuando sobre adrenorreceptores beta se hallaría favorecido de alguna manera por la PGF.

Si esta hipótesis fuera correcta, la adición de PGF exógena, en concentraciones subumbrales, a los segmentos uterinos aislados de ratas en metaestro (donde la PGF generada que se libera al medio de incubación es baja (Ver Tabla 4) debería incrementar la acción beta inhibitoria de NE. Los resultados avalando esta hipótesis se resumen en la figura (38). En ella se muestra la acción de la PGF₂ alfa y de la PGE₂ agregadas

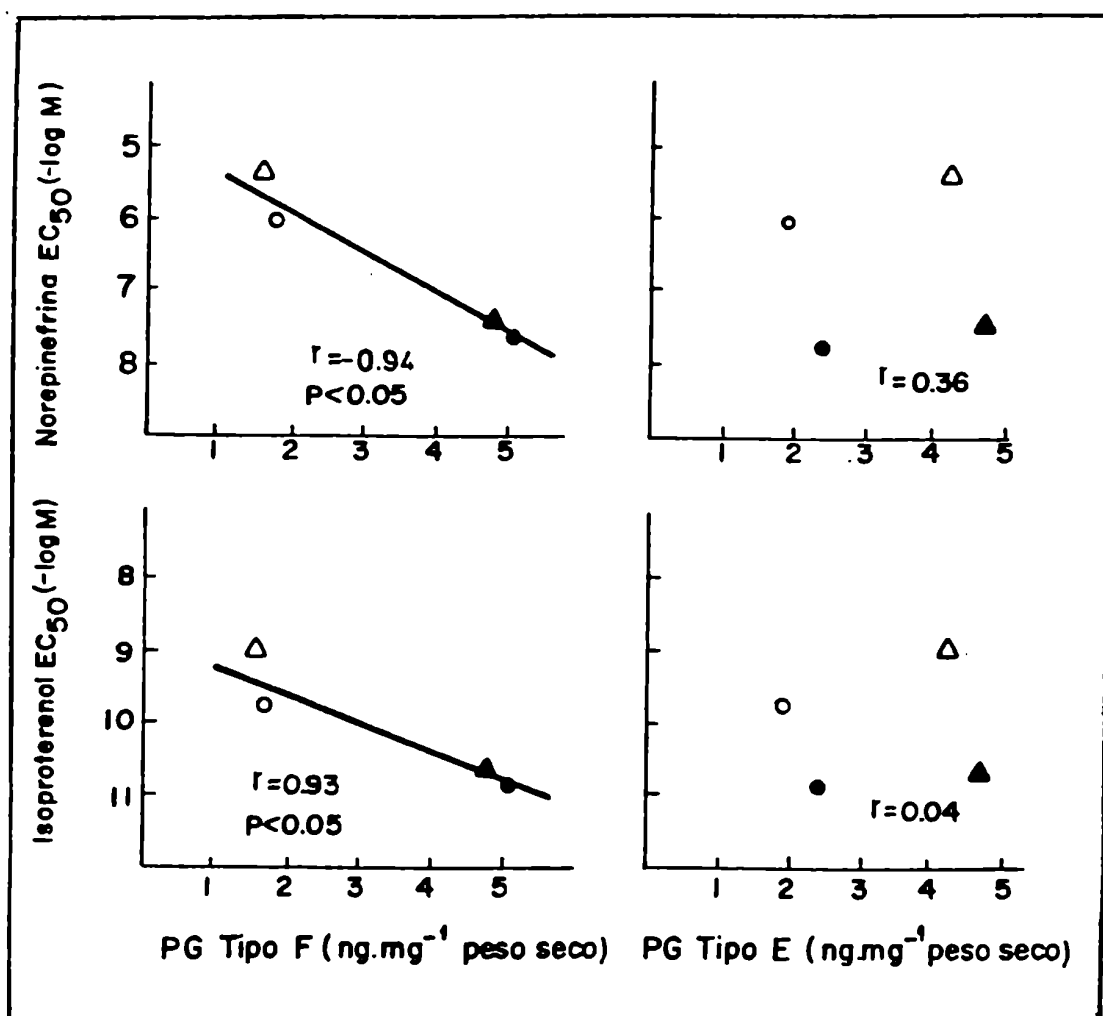


Fig. 37: Correlación entre EC₅₀ para norepinefrina e isoproterenol con PGs tipo E y F generadas por cuernos uterinos aislados en los distintos estadios del ciclo sexual.

proestro ● estró Δ metaestro ▲ diestro

r = coeficiente de correlación

2 minutos antes de efectuar la curva dosis respuesta para NE en segmentos uterinos aislados de ratas en metaestro. Puede observarse que la presencia subumbral de PGF_2 alfa desplaza hacia la izquierda la curva dosis respuesta para NE modificando significativamente ($p < 0.005$) su EC_{50} de $6 \pm 1.8 (10^{-6} \text{M})$ a $3.0 \pm 0.8 (10^{-7} \text{M})$ (Tabla 6).

Además, en presencia de PGF_2 alfa, la acción inhibitoria máxima de NE alcanzó el 100 %.

La PGE_2 no modificó significativamente la respuesta uterina al agonista de adrenorreceptores beta.

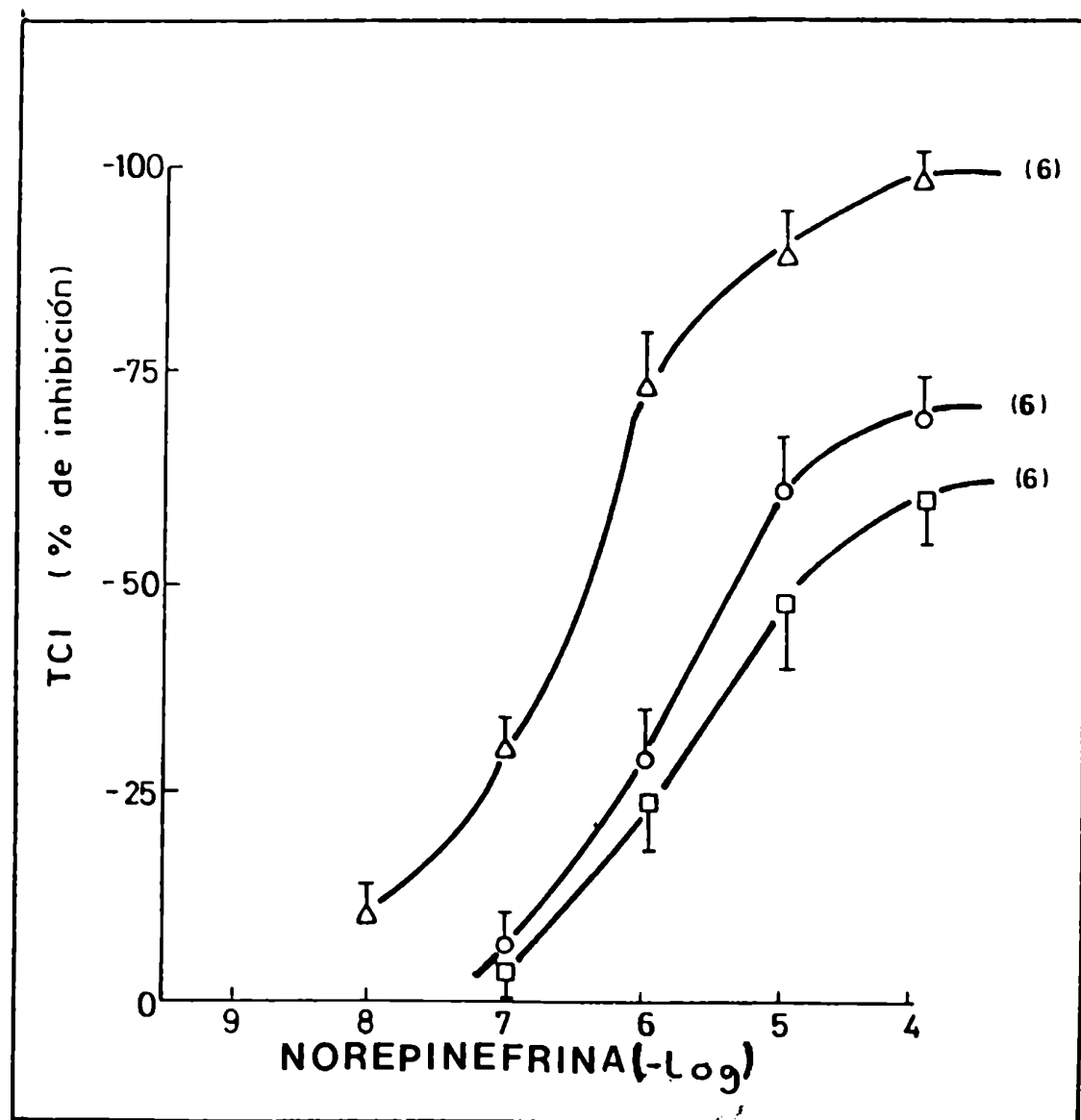


Fig. 38: Efecto de concentraciones subumbrales de PGF₂ alfa y PGE₂ sobre la respuesta contráctil a la norepinefrina de segmentos uterinos aislados de rata en metaestro.

Los resultados se expresan como % de cambio con respecto del control en mg.mg peso seco⁻¹ como Media[±]ETM; (n)

○control Δ+PGF₂ alfa 10⁻⁹M □+PGE₂ 10⁻⁹M

TRATAMIENTO	EC ₅₀ NE
CONTROL	602 ± 1.8 (10 ⁻⁶ M) n= 6
+ PGF ₂ α	3.00 ± 0.8 (10 ⁻⁷ M) n= 6 *
+ PGE ₂	8.48 ± 3.2 (10 ⁻⁶ M) n= 6

Tabla 6: Concentración molar efectiva para el 50 % de inhibición (EC₅₀) de las contracciones uterinas evocadas por norepinefrina durante el metaestro

Los datos se expresan como Media ± ETM; (n)

* tratado vs. control p<0.005

3.4 Determinación de sitios de unión específicos y constante de disociación para DHA ^3H .

Efecto de PGF_2 alfa

Se decidió investigar si la habilidad de la PGF_2 alfa para potenciar la acción de catecolaminas sobre adrenorreceptores beta es consecuencia de un incremento en el número o afinidad de adrenorreceptores uterinos beta para catecolaminas.

Para ello se midió en homogenatos de útero de rata en metaestro, la unión específica de DHA ^3H según se describe en Materiales y Métodos.

En el gráfico de saturación (Fig. 39) se examina el efecto de PGF_2 alfa (10^{-9}M) sobre la unión específica para concentraciones crecientes de DHA ^3H (0.4-16) nM a membranas uterinas.

El análisis posterior de los datos por el método de Scatchard (Fig. 40), no reveló diferencias significativas en la constante de disociación dada por la pendiente (1.2-1.3)nM ni en la concentración máxima de sitios de unión específica para DHA ^3H (B_{max}) (fmol.mg $^{-1}$ de proteína)

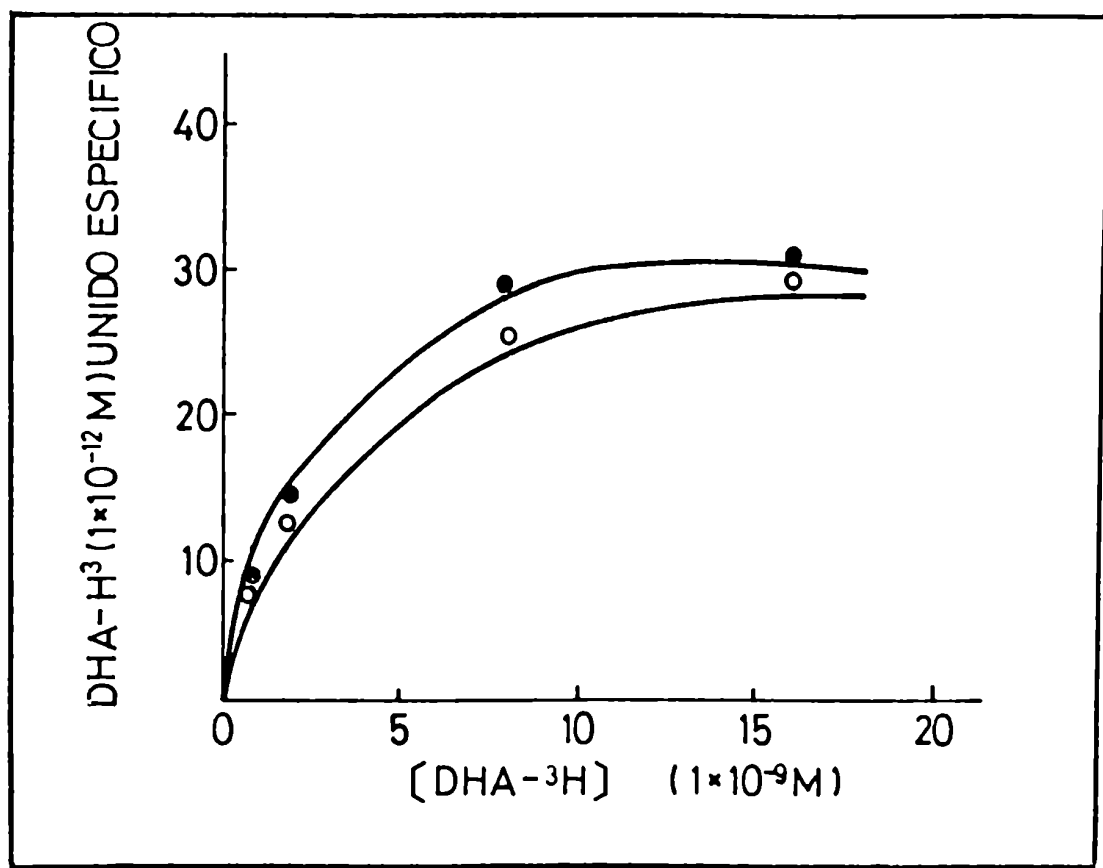


Fig. 39: Unión específica de (DHA-³H) a preparaciones de membranas uterinas de ratas en metaestro como función de concentraciones crecientes de DHA³H

● control ○ +PGF₂α (10⁻⁹)

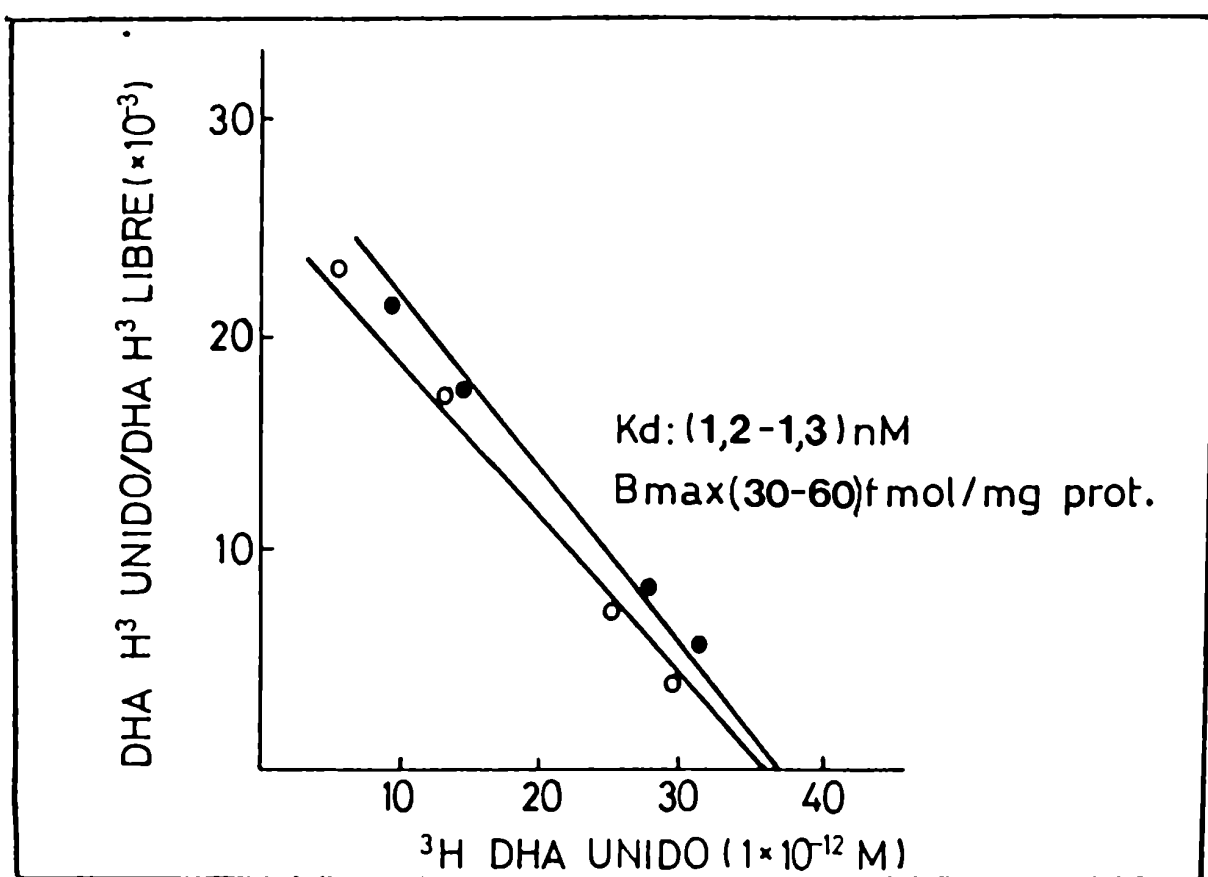


Fig. 40: Gráfico de Scatchard

3.5 Medición de la captación de NE ^3H por segmentos uterinos

Efecto de PGF $_2$ alfa

Con el objeto de dilucidar el mecanismo a través del cual la PGF es capaz de potenciar la acción inotrópica beta-inhibitoria de las catecolaminas, se estudió en segmentos uterinos el efecto de esa PG sobre la captación de NE ^3H , proceso señalado en la introducción que actúa promoviendo una disminución de la concentración efectiva de la amina a nivel de la biofase.

En la figura (41) se muestra la acumulación de NE ^3H en segmentos uterinos aislados de rata en metastro. Puede observarse que la presencia de PGF $_2$ alfa (10^{-9}M) durante la incubación es capaz de disminuir significativamente la captación.

Se evaluó posteriormente la acumulación de NE ^3H en presencia de bloqueantes de la recaptación neuronal (cocaína 10^{-5}M), ó extraneuronal (corticosterona $5 \cdot 10^{-5}\text{M}$). Se observó (Fig.42) que la corticosterona disminuye significativamente la acumulación tisular de NE ^3H . Por el contrario, el tratamiento con cocaína no modifica sustancialmente la magnitud de amina captada. El vehículo utilizado para solubilizar la corticosterona (alcohol 0.5 ul/ml) no modificó los valores controles.

Teniendo en cuenta el efecto producido por la PGF $_2$ alfa exógena, se decidió examinar paralelamente la captación por el útero en estro, dado que en dicho estadio se generan y liberan niveles elevados de PGF.

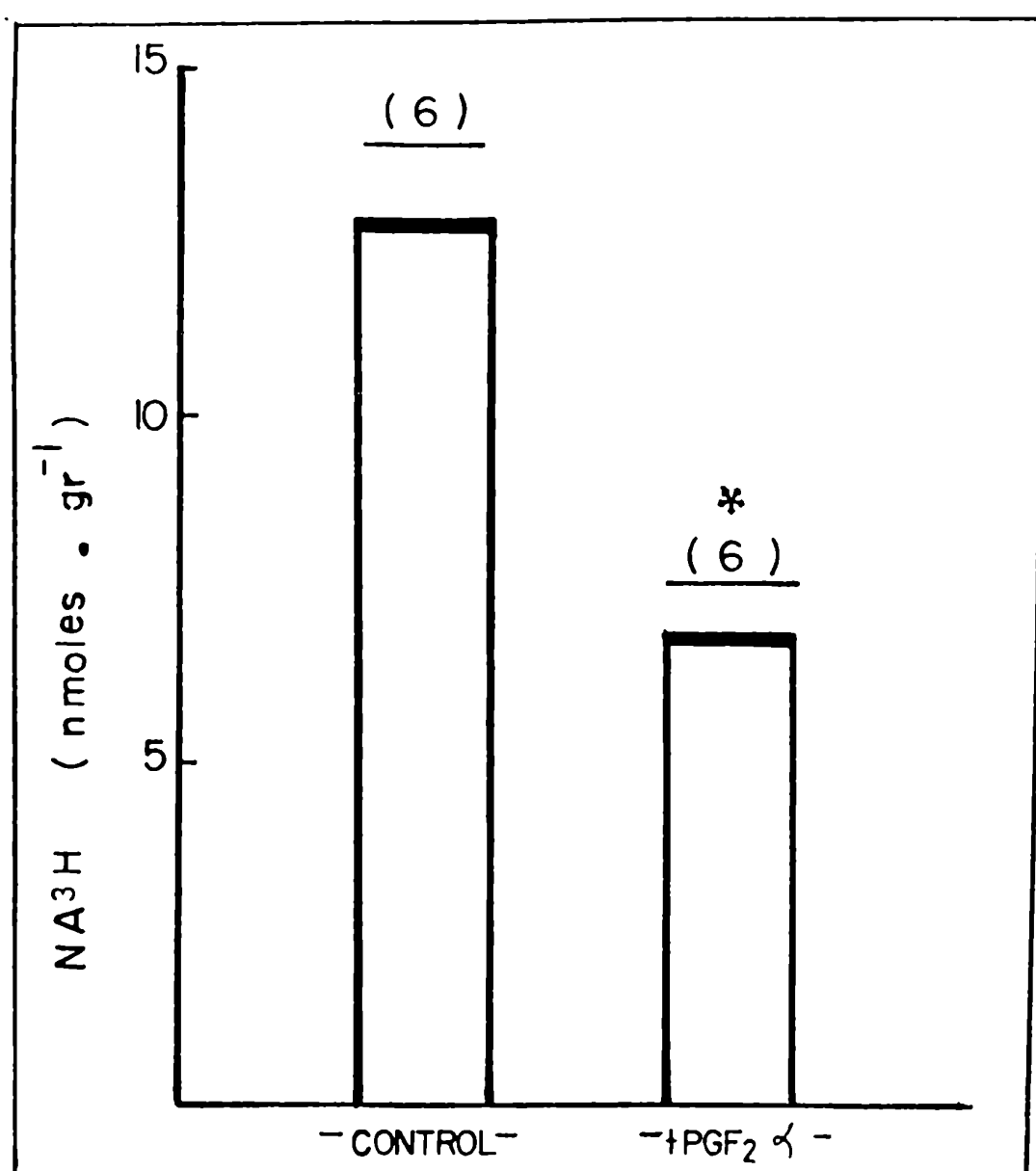


Fig. 41: Captación de NE ³H por segmentos uterinos aislados de ratas en metaestro en presencia o ausencia de PGF₂ alfa (10⁻⁹) en el medio de incubación.

Los datos se expresan en nmol de NE³H.gr peso húmedo⁻¹ como Media \pm ETM; (n)

* tratado vs. control p<0.001

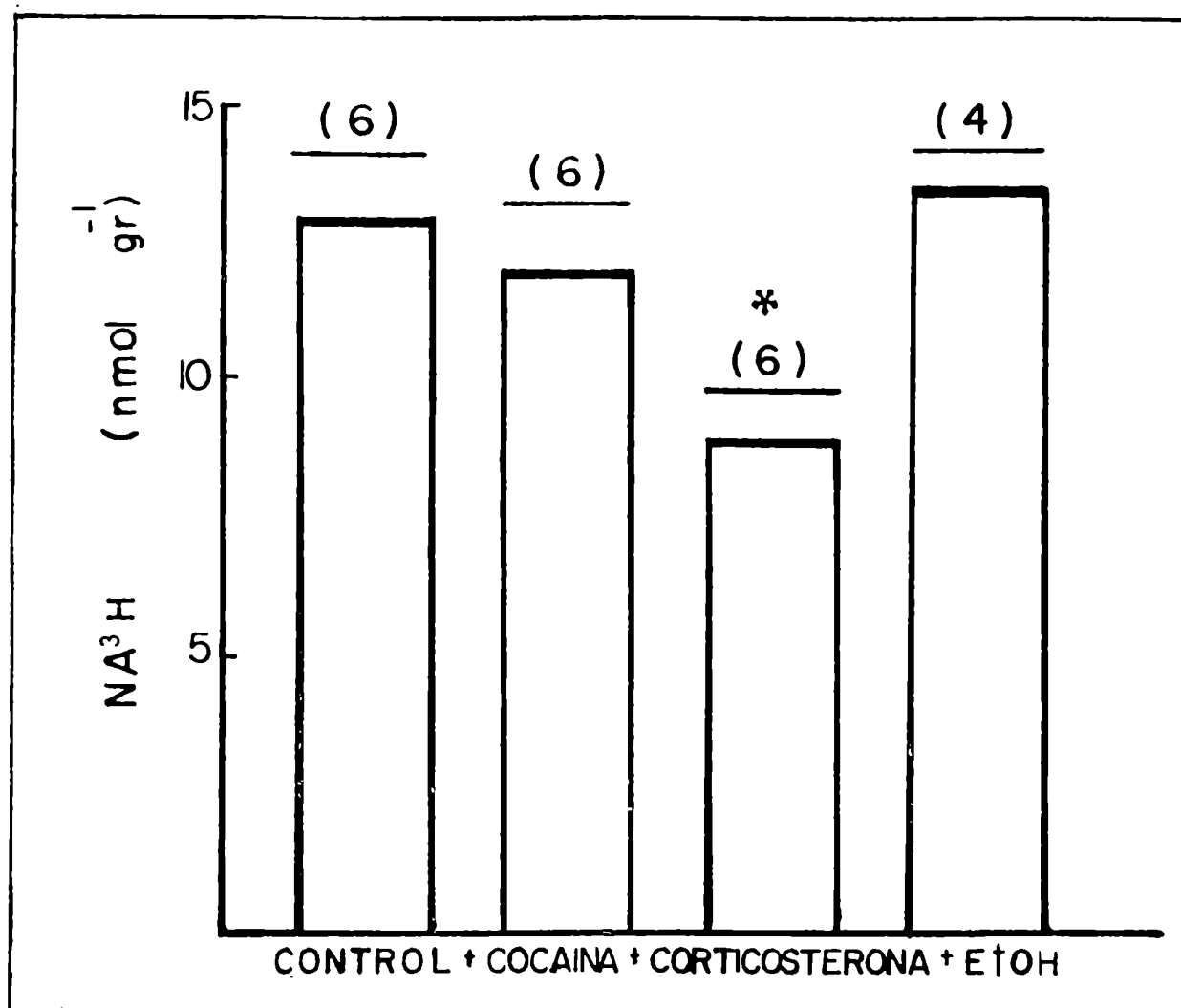


Fig. 42: Captación de NE ³H por segmentos uterinos aislados de ratas en metaestro en presencia de bloqueantes de la recaptación neuronal (cocaína 10⁻⁵ M), o extraneuronal (corticosterona 5.10⁻⁵ M), o solvente (etanol 0.5ul/ml)

Los datos se expresan en nmol.gr peso húmedo⁻¹ como Media[±]ETM; (n)

* tratado vs. control p<0.02

En estro (Fig. 43), la NE ^3H captada fue significativamente menor que en metaestro, observandose un incremento cuando las preparaciones habían sido tratadas con ácido acetil salicílico (inhibidor de la síntesis de PGs), efecto que fue revertido por el agregado de PGF_2 alfa exógena (Fig. 44)

La presencia de inhibidores de la recaptación neuronal y extraneuronal en el medio de incubación (Fig. 45) no alteró la magnitud de NE ^3H acumulada por el útero en estro.

El vehículo utilizado para solubilizar la corticosterona (alcohol 0.5/ml) no modificó los valores controles.

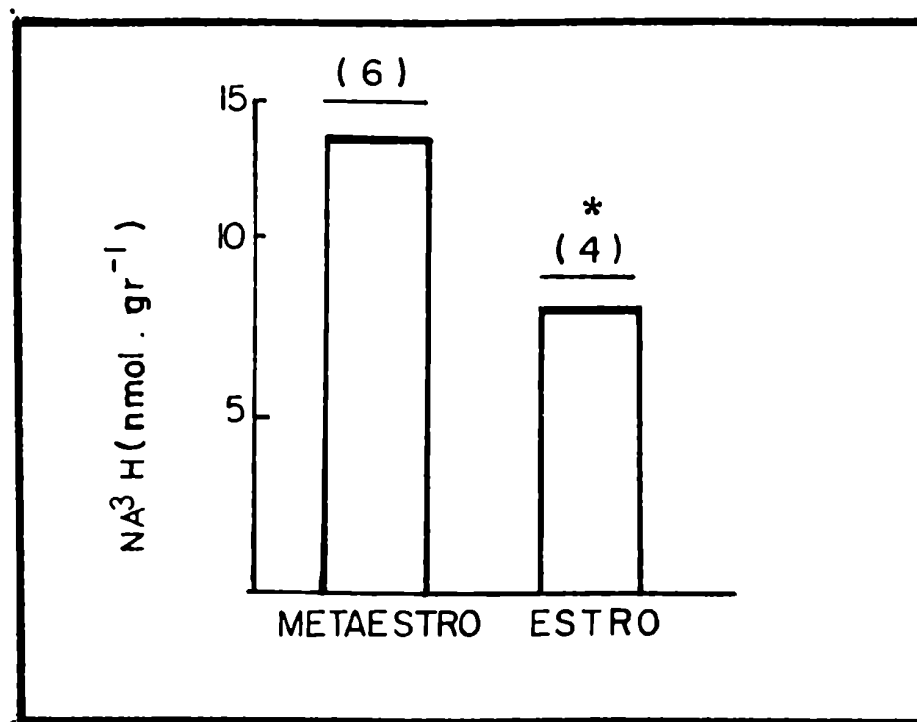


Fig. 43: Captación de NE ³H por segmentos uterinos aislados de rata en metaestro y estro.

* metaestro vs. estro $p < 0.02$

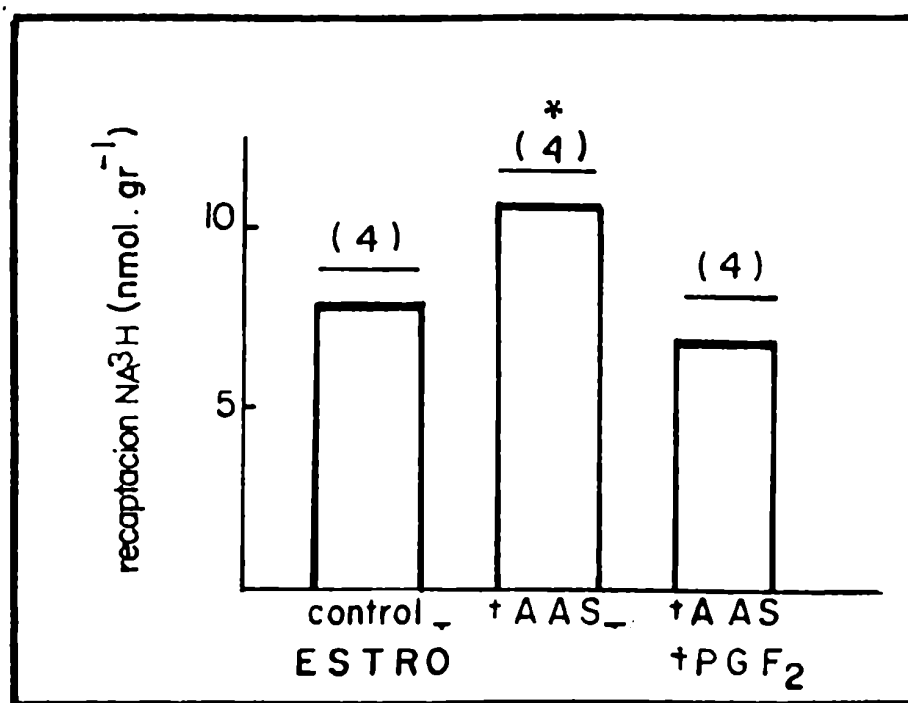


Fig. 44: Captación de NE ³H por segmentos uterinos aislados de ratas en estro e incubados en presencia o ausencia de ácido acetil salicílico 10⁻⁴M; con o sin PGF₂ alfa

* tratado vs. control p < 0.05

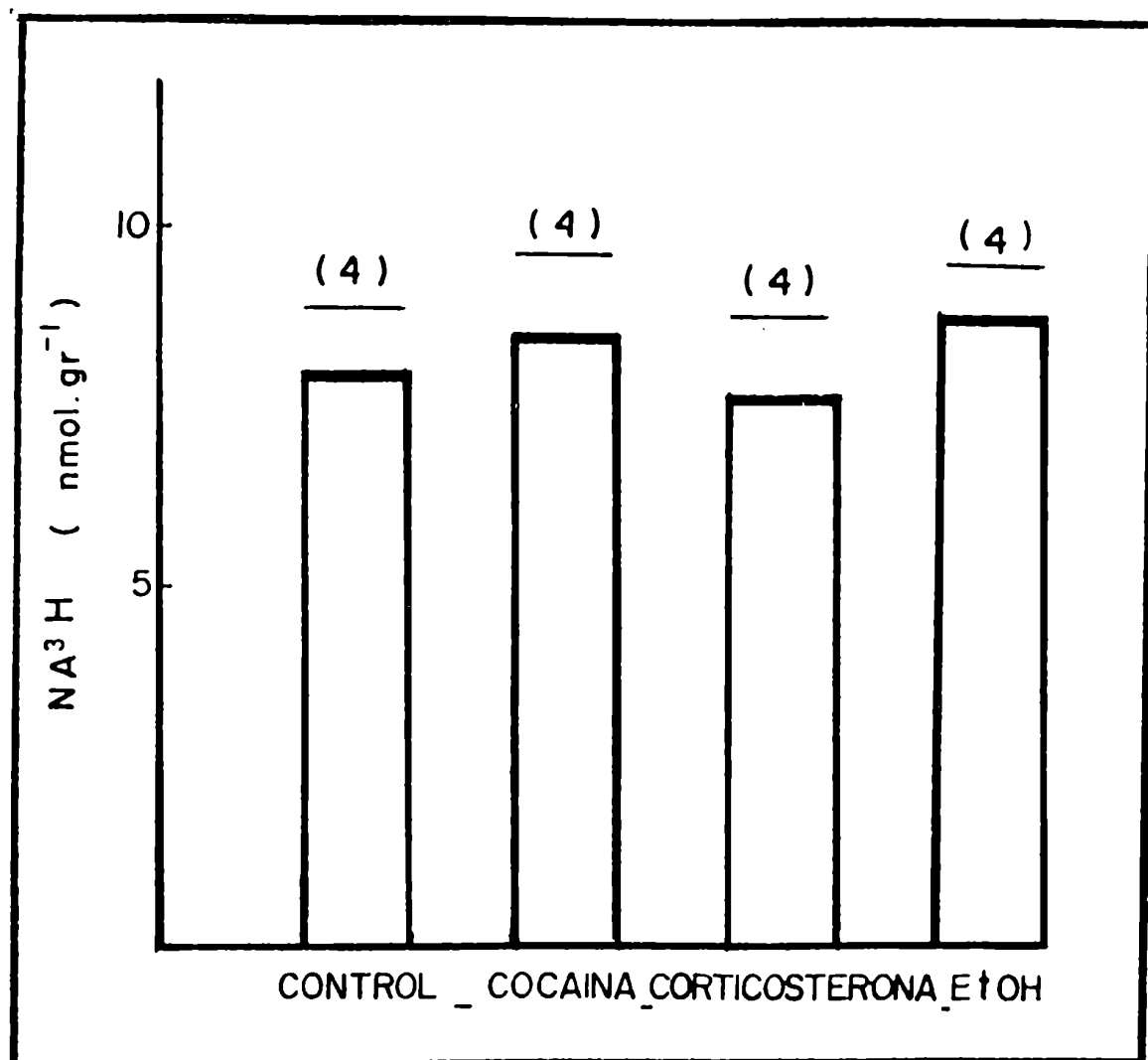


Fig. 45: Captación de NE^3H por segmentos uterinos aislados de rata en estro incubados en presencia de cocaína $10^{-5}M$, corticosterona $5 \cdot 10^{-5}M$ ó etanol $0.5 \mu l/ml$

CAPITULO IV

DISCUSION

Las prostaglandinas exógenas son potentes agentes estimulantes de las contracciones uterinas y se ha señalado en la introducción que el útero exhibe gran capacidad de síntesis local de estos autacoides, la cual parece estar influenciada por hormonas sexuales. Si bien tanto los estrógenos como la progesterona estarían implicadas, los resultados obtenidos son conflictivos: Sharma y col (229) observaron que el 17-beta estradiol incrementa la síntesis de PGE en el útero de rata, mientras que otros autores (96) (240) hallaron que esa hormona disminuye la producción de PGE y que la progesterona bloquea dicho efecto. Sin embargo, Castracane (50) halló una acción opuesta para la progesterona.

La función miometral también se hallaría regulada por hormonas sexuales, aunque su papel como moduladores de la motilidad es menos contradictorio y existen abundantes evidencias de que mientras la castración mejora la actividad contráctil, la estrogeinización la inhibe (46)(85)(163). Sin embargo, a pesar de ser el útero de rata el modelo experimental más frecuentemente utilizado en estos estudios y que se halla naturalmente sujeto a fluctuaciones cíclicas del entorno hormonal, no se ha encarado un estudio fisiológico de su comportamiento contráctil a lo largo del ciclo sexual. Asimismo, son escasas las observaciones sobre el perfil de PGs generadas

localmente por el útero de rata a través de los distintos estados endócrinos.

En vista de que las evidencias que sugieren que las PGs estarían implicadas en la motilidad espontánea del útero han surgido principalmente de modelos experimentales poco fisiológicos tales como el útero de rata ovariectomizada sometida o no a terapias de restitución hormonal, fue propósito del presente trabajo examinar la participación de las PGs sobre las contracciones del útero de rata intacto.

Con este fin se decidió encarar un análisis simultáneo de la motilidad espontánea y la producción de diversas PGs por el útero de rata aislado durante los distintos días del ciclo sexual.

Debe tenerse en consideración que la liberación de PGs es equiparable con su síntesis ya que son inmediatamente liberadas de los tejidos que las generan, sin almacenamiento apreciable en los mismos (208) (32).

Los resultados obtenidos muestran claras variaciones en la tensión y en la frecuencia desarrollada así como en la síntesis y/o liberación de PGs del tipo E y F al medio de incubación por el útero de rata aislado en diferentes días del ciclo sexual.

La tensión y la frecuencia contráctil inicial (postaislamiento) y estabilidad en el tiempo, indicó, una pobre motilidad en proestro y estro y, coincidentemente, la liberación de

PGE en ambos fue baja. En metaestro y diestro, por el contrario, la liberación de PGE fue alta y la tensión y la frecuencia contráctil se mantuvieron estables a lo largo del tiempo.

Si bien los valores de PGF liberada variaron a través del ciclo, no se observó un paralelismo con la motilidad espontánea.

Se diseñaron experimentos tendientes a determinar si la motilidad uterina se vincula con PGs de tipo E y F. Ello se encaró en razón de la relación hallada entre las PGs, fundamentalmente de tipo E, con la actividad espontánea.

Se observó entonces que la inhibición de la síntesis de PGs tanto con indometacina como con ácido acetil salicílico, afectó la motilidad de los cuernos uterinos, principalmente en los estadios de metaestro y diestro, en los cuales la producción de PGE es elevada y la actividad contráctil muy estable.

Los datos hasta el momento permitirían sugerir que la PGE sería responsable, al menos en parte, de la motilidad espontánea dado que parecería existir una relación directa con los niveles de PGE pero no, con los de PGF. Sin embargo, si la sensibilidad del útero a dichas PGs variara a lo largo del ciclo sexual, la hipótesis apuntada perdería validez. Para comprobar esta posibilidad, se construyeron curvas dosis respuesta para PGE_2 y PGF_2 alfa en cuernos uterinos aislados de rata en distintos estadios del ciclo sexual. Se observó

que la sensibilidad inotrópica uterina para cada PG estudiada no varía con el ciclo estral, hallándose una estrecha superposición de las curvas de estimulación. Este hecho motivó la expresión de los resultados en forma numérica por medio de los EC50. Si bien la sensibilidad uterina frente a la PGE_2 parece ser mayor que frente a la PGF_2 alfa en todos los estados analizados, la diferencia no es significativa. La potencia inotrópica estimulante de ambas PGs sobre el útero intacto es similar, además, a la observada en trabajos previos realizados sobre preparaciones uterinas de rata ovariectomizadas (86). Ello indica que las variaciones del entorno hormonal no afectan la sensibilidad uterina para estas PGs.

Gimeno y col. (87), utilizando un antagonista de PGs, el PPP, lograron abolir la motilidad espontánea del útero de rata ovariectomizada, sugiriendo un papel para las PGs en la motilidad uterina. A la misma conclusión arribaron Vane y Willams (258) al inhibir con indometacina, la actividad contráctil y la liberación de PGs desde el útero de rata preñada. Los resultados aquí presentados confirman la participación de las PGs en la motilidad espontánea del útero de rata intacto, ya que el empleo de inhibidores de síntesis de PGs bloqueó la actividad uterina. Sin embargo, las características del diseño experimental, como es el examen simultáneo de la motilidad y la producción de PGs a lo largo del ciclo sexual, permitió valorar además, la contribución diferencial de cada PG en la actividad contráctil. Así, en el estro, los niveles de PGE son bajos y

aunque la producción de PGF es elevada, la motilidad uterina es pobre. Por el contrario, en metaestro la síntesis de PGE es alta y la motilidad estable a pesar de que la PGF generada en este estadio es reducida.

Esta coincidencia entre la actividad espontánea y la PGE y no con la PGF, se visualiza también en el proestro y el diestro. El grado de interrelación causal entre ambos sucesos fue estimado por medio de coeficientes de correlación. Estos índices reflejaron que la estabilidad de la tensión y la frecuencia contráctil del útero aislado de ratas en los distintos días del ciclo sexual, se correlacionan solamente con la producción de PGE, alcanzando los respectivos valores de 0.97 y 0.94.

Se examinó también la capacidad del útero aislado de rata en distintos estadios del ciclo sexual para generar PG tipo I_2 .

Se observó una liberación comparativamente menor que la de las otras PGs cuantificadas. Además, las variaciones de la motilidad no se acompañaron por cambios concomitantes de PG tipo I_2 , ya que excepto en diestro, donde se hallaron niveles más altos, existe una liberación similar en los diferentes días del ciclo sexual.

En vista de que por estudios realizados con anterioridad se demostraba que en condiciones hormonales opuestas, tales como las del útero de rata ovariectomizada, sometida o no a estrogeneización y en el estro natural (86) (259) la sensibilidad uterina a la acción estimulante de PGI_2 exógena es

100 veces menor que a PGE_2 o PGF_2 alfa, parece poco probable que dicha PG tenga una participación apreciable en la motilidad uterina.

Los niveles plasmáticos de los esteroides sexuales secretados por el ovario varían cíclicamente a través del ciclo sexual (Fig. 3). Los resultados obtenidos en el presente trabajo reflejan que las fluctuaciones en el entorno hormonal uterino coinciden o se asocian con variaciones en la motilidad espontánea en los distintos días del ciclo sexual. Así, aquellos estadios sujetos a una influencia estrogénica intensa, proestro y estro, coinciden con una pobre actividad contráctil uterina, confirmando las observaciones realizadas por diversos autores acerca de la acción inhibitoria del estradiol sobre la motilidad del útero de rata ovariectomizada (46) (85) (163).

Se observó también que el perfil de la síntesis de PGs es característico para cada estadio hormonal. En estro y proestro se generan niveles bajos de PGE, lo cual concuerda con la disminución de la síntesis de PGE hallada por Ham (96), Sterin-Speziale (240) y Thaler-Dao (250) en útero de rata ovariectomizada por acción del 17-beta estradiol.

Del análisis conjunto de los datos presentados se evidencia una clara dependencia de la motilidad a la PGE y, en vista de que las hormonas sexuales influyen en ambos fenómenos, se decidió obtener información adicional para evaluar la posibilidad de que dichos esteroides regulen la actividad contráctil a tra-

vés de una modulación de la síntesis de PGs (probablemente la PGE). Con este propósito se estudió el efecto de estrógenos y progesterona sobre la motilidad y liberación de PGs utilizando como modelo experimental el útero aislado de rata inmadura de 25 días; preparación que se halla bajo la influencia de bajas concentraciones de hormonas ováricas (201)(175)(174)(63) y cuyo comportamiento contráctil y capacidad de biosintetizar PGs no ha habido sido explorado hasta el presente.

Pudo observarse que la tensión isométrica después del aislamiento de los cuernos uterinos de ratas inmaduras se incrementa significativamente ante un tratamiento "in vivo" con 17-beta estradiol o con progesterona. Probablemente ello es debido a una acción trófica de estas hormonas sexuales (152), aunque debe notarse que la frecuencia contráctil inicial, no sufrió modificaciones con ambos tratamientos.

El estudio de la estabilidad en el tiempo de la tensión y la frecuencia contráctil, indicó que el útero de rata prepúber posee una buena motilidad espontánea, sin caída apreciable de la misma al cabo de 60 minutos.

La cuantificación de las PGs liberadas por dichos cuernos uterinos en actividad arrojó resultados positivos. Los cuernos aislados de ratas inmaduras generan niveles más altos de PGs que los de ratas adultas, siendo los de FGE significativamente mayores que los de PGF.

La estrogeinización de los animales afectó negativamente la síntesis de PGE, inhibiéndola en un 85% con respecto del grupo control y coincidentemente se observó una caída significativa de la tensión contráctil. Por su parte, la generación de PGF no varió con este tratamiento.

Los cuernos uterinos aislados de ratas inyectadas con progesterona, liberaron cantidades similares de PGE que los del grupo control y al igual que en esas preparaciones la tensión contráctil se mantuvo estable a lo largo del tiempo de experimentación. La progesterona, sin embargo, incrementó significativamente la síntesis de PGF uterina.

La frecuencia de las contracciones espontáneas es relativamente estable tanto en los cuernos del grupo control como en el estrogeneizado. El grupo de animales inyectados con progesterona mostró a través del tiempo un decremento menor de la frecuencia, sin que tengamos hasta el presente una explicación satisfactoria de la acentuada estabilidad.

Sobre la base de estos resultados puede concluirse que el útero de rata prepúber posee una buena motilidad espontánea que parece depender, al menos en parte, de la síntesis de PGs endógena. En efecto, tanto la indometacina como el ácido acetil salicílico deprimieron significativamente las contracciones y la inyección de los animales con hormonas sexuales fue capaz de alterar tanto la síntesis de PGs como la contracciones.

Los datos experimentales presentados coinciden con las ob-

servaciones previas al presente trabajo obtenidas en el útero de rata a través del ciclo sexual y que revelaron que cuando decae la liberación de PGE al medio de incubación por influencia de estrógenos, la actividad mecánica del útero aislado también disminuye .

Se señaló en la introducción que el útero presenta inervación colinérgica y adrenérgica (5). Esta última se halla compuesta por las típicas neuronas postganglionares largas y por neuronas postganglionares cortas(233). El músculo liso uterino, dado que corresponde a la categoría de los denominados "unitarios", posee contracciones de tipo miogénico pero que pueden ser moduladas por acción neurogénica (172). Por su parte, los esteroides sexuales parecen regularla actividad nerviosa. Se observó así que los axones de dichas neuronas adrenérgicas postganglionares cortas del miometrio de conejo muestran un incremento de su contenido de norepinefrina luego de un tratamiento con 17-beta estradiol (117). El mismo efecto fue documentado por Flack y col. (72) en el útero de rata. En el cobayo, por su parte la influencia hormonal sobre ese tipo neuronal modifica el recambio de norepinefrina (172).

La presencia de adrenorreceptores excitatorios e inhibitorios ha sido ampliamente reconocida en el útero de rata (252) (36) y las hormonas sexuales ejercen además, un marcado efecto en las fluctuaciones del número de adrenorreceptores uterinos. Willams y col. (268) y Roberts y col. (216) observa-

ron una regulación de los alfa adrenorreceptores del miometrio de conejo por estrógenos y progesterona. Krall y col. (144), trabajando con el útero de rata, hallaron una marcada sensibilidad de los beta adrenorreceptores frente a los cambios fisiológicos de hormonas esteroideas sexuales durante el ciclo sexual. Teniendo en cuenta que la variación cíclica del estado endócrino también modula la síntesis de PGs, se diseñaron una serie de experimentos para estudiar si las PGs influyen las respuestas del músculo liso uterino a las catecolaminas.

La reactividad del útero aislado de rata ante varios agonistas de adrenorreceptores fue examinada construyendo curvas dosis respuesta de tipo acumulativo en distintos días del ciclo sexual.

La norepinefrina, el agonista fisiológico, ejerció al igual que el isoproterenol, un efecto inotrópico negativo, aunque de menor potencia, sobre las contracciones uterinas en todos los estadios del ciclo estral.

La acción depresora fue abolida totalmente por propranolol, un antagonista beta selectivo.

La influencia inhibitoria de NE e ISO varió significativamente en los distintos días del ciclo sexual. Este resultado no coincide con el trabajo de Abdel Aziz Barky (1), quien no encontró diferencias en la acción inhibitoria a varias catecolaminas durante el ciclo sexual de la rata. Sin embargo, existen considerables evidencias de que la sensibilidad a los agonistas de adrenorreceptores varía con el estado endó-

crino del útero (171)(37) y nosotros encontramos que los EC50 obtenidos para NE e ISO reflejan claramente una sensibilidad beta similar en estro y diestro, aunque significativamente mayor que en proestro y mas elevada aún que la del metaestro, período caracterizado por su poca sensibilidad a la acción depresora de dichos agonistas.

Al analizar la interrelación entre las PGs de tipo E y F liberadas al medio de incubación y los EC50 de agonistas beta, se halló una correlación positiva entre la PG de tipo F generada por los cuernos uterinos aislados en proestro, estro, metaestro y diestro y la acción beta inhibitoria de NE e ISO, siendo los coeficientes respectivos: 0.94 y 0.93. Por el contrario, la liberación de PGE no se correlacionó con el efecto beta adrenorreceptivo.

Examinando la correlación entre la PGF y el efecto beta inhibitorio de NE e ISO se puede observar que los estadios en los que se generan elevados niveles de PGF presentan mayor sensibilidad frente a dichos agonistas beta. Sobre la base de estos resultados es posible sugerir que la PGF favorecería los efectos de las catecolaminas actuando sobre los adrenorreceptores beta. Para confirmar esta hipótesis se estudió el efecto de concentraciones subumbrales de PGF₂ alfa sobre la reactividad al agonista de adrenorreceptores beta norepinefrina del útero de rata en metaestro. Este estadio fue ele-

gido porque en élse producen niveles bajos de PGF y ello evita el empleo de inhibidores de síntesis de PGs. En efecto, si bien la ausencia de PGs endógenas permitiría comprobar el efecto de PGF sin interferencias, ocasionaría también una inhibición de la motilidad espontánea, imposibilitando la observación de la acción inotrópica negativa de la NE.

Avalando esta hipótesis, la PGF_2 alfa, produjo un corrimiento significativo hacia la izquierda de la curva dosis respuesta para NE, lo cual indica que la PGF favorece de alguna manera la respuesta mediada por adrenorreceptores beta. De acuerdo con esto, la depresión de las contracciones uterinas en presencia de PGF_2 alfa fue total, alcanzándose el 100% de inhibición.

Por el contrario, la PGE_2 , no alteró la respuesta uterina a dicho agonista de los adrenorreceptores beta.

Existen abundantes evidencias indicativas de que las PGs liberadas en la proximidad de las uniones neuroefectoras autonómicas influyen la liberación de NE desde los terminales nerviosos y se ha sugerido que las PGs serían importantes moduladores de la transmisión neuroefectora adrenérgica.

En el oviducto humano, la liberación de NE inducida por estímulo eléctrico de los terminales adrenérgicos es inhibida en presencia de PGE_2 (181). Observaciones similares fueron registradas en corazón de conejo y en numerosos lechos vasculares (264) (77) (243).

Aunque escasos, existen trabajos indicando una acción opuesta para las PGs de la serie F. En tejidos vasculares, se halló que la PGF_2 alfa es estimulante de la liberación del neurotransmisor adrenérgico inducida por estímulo eléctrico (41). Se ha demostrado además, en tejidos vasculares, que la PGF_2 alfa puede ejercer un efecto estimulante de la respuesta del tejido efector frente a la NE exógena, independientemente de su acción sobre la liberación de neurotransmisor inducida por estímulo eléctrico (137) (168). Ello sugeriría una acción de las PGs a nivel de la membrana efectora, modificando la reactividad tisular a las catecolaminas.

Estas evidencias coinciden estrechamente con los resultados presentados en este trabajo ya que también ponen en evidencia en presencia de PGF_2 alfa, un incremento de la respuesta uterina frente a la NE exógena.

En vista de que en nuestro diseño experimental no se empleó estimulación eléctrica, la liberación espontánea o basal en esas condiciones es insuficiente para desencadenar respuestas en el tejido efector (44). Por lo tanto y aunque no se descarta, parece poco probable que la potenciación de las respuestas mediadas por activación de adrenorreceptores beta observadas sea la consecuencia de una acción de esta PG sobre los terminales neurales.

Se desconoce el mecanismo de acción por el cual la PG modularía la reactividad de la membrana de la célula efectora a

la norepinefrina. Como un primer intento para explorar un probable mecanismo de acción, se examinó la influencia de esa PG sobre la afinidad y número de beta adrenorreceptores de membranas uterinas de rata en metaestro. No se verificó que la presencia de PGF modifique significativamente ninguno de los dos parámetros tras el empleo de las técnicas usuales de unión específica a receptores beta empleando el radioligando DHA ³H.

Varios esteroides potencian las acciones de las catecolaminas en diversos tejidos. Kauman (141) encuentra una potenciación con hidrocortisona de los efectos de norepinefrina e isoproterenol en corazón de gato. Lo mismo documenta Kalsner (138) en la aorta del conejo.

Un incremento de los efectos relajantes del ISO y de la NE en bronquios de cerdo fue observado por Foster (76) como consecuencia de la acción de 17-beta estradiol, progesterona y corticosterona. Estos hallazgos sugirieron que la potenciación era una consecuencia de la inhibición de la recaptación extraneuronal de los agonistas por dichas hormonas.

En este sentido, se ha demostrado que el 17-beta estradiol, la corticosterona, la progesterona y la testosterona inhiben en forma concentración dependiente la captación de NA³H por el mecanismo extraneuronal en el corazón de rata y en las arterias coronarias de gato y que la potencia inhibitoria depende del tipo de esteroide y del tejido analizado (54) (130) (34).

Asimismo, el 17-beta estradiol redujo en el útero humano la acumulación de NE ^3H (206).

Dadas las numerosas evidencias indicando que las hormonas esteroideas disminuyen la recaptación, Boyle (37) estudió si esta se modificaba a lo largo del ciclo estral. Pudo así comprobar que en el útero de rata, la captación de NE ^3H varía en los distintos días del ciclo sexual.

En el presente trabajo se observó que los niveles de PGF generados por el útero aislado varían en los distintos estadios del ciclo sexual y se correlacionan positivamente con la reactividad uterina frente a los agonistas beta.

Se demostró asimismo que la PGF₂ alfa exógena es capaz de potenciar la acción depresora de la NE por activación de los adrenorreceptores beta del útero de rata en metaestro. (baja producción de PGF endógena).

Teniendo en cuenta que la captación de NA ^3H también varía en los distintos días del ciclo sexual (37) y dado que el grado de remoción de la amina a nivel de la biofase neuroefectora podría ser importante para determinar el grado de depresión de la motilidad uterina por agonistas beta, se examinó si la PGF exógena puede influenciar la captación de NE ^3H por el útero de rata en metaestro.

Efectivamente, pudo observarse que las preparaciones uteri-

nas de ratas en metaestro captan, en presencia de PGF_2 alfa, cantidades significativamente menores de NE^3H .

El tratamiento con cocaína (bloqueante de recaptación neuronal) no modificó sustancialmente la magnitud de NE^3H acumulada, pero esta disminuyó significativamente en las preparaciones expuestas a la corticosterona (bloqueante de la recaptación extraneuronal).

Parece entonces, que la presencia de PGF exógena, al inhibir probablemente la recaptación extraneuronal, elevaría la disponibilidad de amina a nivel de la biofase, determinando una potenciación del efecto uterotrópico negativo que ejerce la NE durante el metaestro.

El útero de rata en estro posee características opuestas al del metaestro ya que genera niveles altos de PGF y posee gran sensibilidad para los agonistas de adrenorreceptores beta.

Se decidió entonces, estudiar también la captación de NE^3H por el útero de rata en estro.

Pudo observarse que en el útero en estro, la acumulación de NE^3H es significativamente menor que en metaestro.

Dada la influencia depresora que tiene la PGF exógena sobre la captación en metaestro y considerando que el estro presenta niveles naturalmente elevados de PGF endógena, se expuso el útero en estro a la presencia de ácido acetil salicílico (inhibidor de la síntesis de PGs).

Esta situación condujo a un aumento de la acumulación de NE^3H

y tal estimulación pudo ser revertida con PGF_2 alfa exógena.

A diferencia del metaestro, donde la corticosterona produjo una disminución leve pero significativa de la acumulación de amina, no modificó en estro dicha acumulación. Este resultado presenta estrecha similitud con lo que sucede en otros tejidos tales como membrana nictitante (89) y aorta de conejo (251), donde se postula la existencia de un sistema de recaptación extraneuronal que es resistente a la inhibición por corticosterona.

Si bien las opiniones en cuanto a la regulación por hormonas sexuales de la síntesis de PGE uterina no son uniformes, la amplia mayoría de los autores sostiene que los estrógenos influyen negativamente dicha síntesis (147) (96) (3) (240) (250).

El papel de estrógenos y progesterona sobre la generación de PGF es aún mas contradictoria, sobre todo en lo que atañe a los estudios que se realizaron en modelos simplificados como el útero de rata ovariectomizada tratado con hormonas. Es claro sin embargo, que las hormonas afectan dicha síntesis, lo cual concuerda con las observaciones del presente trabajo efectuadas en condiciones más fisiológicas.

Asimismo, las hormonas sexuales regulan la recaptación extraneuronal uterina de catecolaminas, pero no se ha aclarado aún cual sería la importancia fisiológica del fenómeno en los diversos tejidos. Esto permite sugerir, sobre la base de los

resultados obtenidos, que al menos en parte las hormonas sexuales ejercerían su acción antagonista de la recaptación a través de modular la síntesis de PGF.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

- 1- Las prostaglandinas participan en la motilidad del útero de rata porque:
 - a. Inhibidores de síntesis de PGs disminuyen la motilidad espontánea uterina.
 - b. El útero sintetiza y/o libera PGs y dicha síntesis se modifica a lo largo del ciclo sexual.
 - c. La actividad espontánea uterina varía de acuerdo con el día del ciclo estudiado y se correlaciona con las variaciones en la síntesis de PGE.
 - d. En el útero de rata prepúber, la administración de estradiol disminuiría la motilidad al menos en parte a través de una inhibición de la síntesis de PGE.

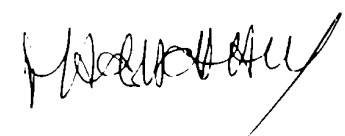
- 2- Las prostaglandinas participan en la respuesta adrenérgica del útero de rata porque:
 - a. La respuesta mediada por agonistas de adrenorreceptores beta varía a lo largo del ciclo sexual coincidentemente con la producción de PGF.
 - b. La PGF₂ alfa exógena potencia en el útero en metaestro (una preparación que tiene baja producción de PGF) la

acción depresora de la motilidad de los agonistas beta.

- c. La captación de NE ^3H por el útero de rata en metaestro, es disminuída significativamente por la PGF exógena, lo cual conduciría a un incremento de la amina a nivel de la biofase neuroefectora.
- d. El útero de rata en estro (preparación que genera naturalmente niveles elevados de PGF), presenta menor captación de NE ^3H que en metaestro. La inhibición de la síntesis de PGs incrementa significativamente la acumulación de NE ^3H , lo cual es revertido por PGF exógena.



M. F. DE GIMENO



MARGA ALICIA (HAU).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Abdel-Aziz A., Barky E. (1973)
J. Reprod. Fert. 35:217
- 2.- Abdel-Halim M.S., Hamberg M., Sjöqvist B., Ånggård E. (1977)
Prostaglandins 14:633
- 3.- Abel M.H., Baird D.T. (1980)
Endocrinology 106(5):1599
- 4.- Adelstein R.S., Eisenberg E. (1980)
Ann. Rev. Biochem. 49:921
- 5.- Adham N., Schenk E. (1969)
Am. J. Obstet. Gynecol 104:508
- 6.- Adler-Grachinsky E., Langer S.Z. (1975)
Br. J. Pharmacol 53:43
- 7.- Ahern D.G., Downing D.T. (1970)
Biochim. Biophys Acta 210:456
- 8.- Ahlquist R.P. (1948)
Am. J. Physiol 153:586
- 9.- Aiken J.W. (1974)
Prostaglandin Synthetase Inhibitors
ed. Robinson H. Vane J. ; Raven Press NY pp.289
- 10.- Almgren O., Jonason J. (1974)
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol 283:1
- 11.- Anderson J.N., Peck E.J., Clark J.H. (1975)
Endocrinology 96:160
- 12.- Ånggård E., Larsson C., Samuelsson B. (1970)
Acta Physiol Scand 81:396

- 13.- Anggård E., Samuelsson B. (1965)
J. Biol. Chem. 240:3518
- 14.- Anggård E. Samuelsson B. (1969)
Methods Enzimol 14:215
- 15.- Ashton F.T., Somlyo A.V., Somlyo A.P. (1975)
J. Mol. Biol. 98:17
- 16.- Attrep K., Bellman W., Attrep M. (1979)
Lipids 15(5):292
- 17.- Axelrod J. (1966)
Pharmacol Rev. 18:95
- 18.- Batra S., Sjögren C. (1983)
Life Sciences 32:315
- 19.- Bentley S.M., Drew G.M., Whiting S.B. (1977)
Br. J. Pharmacol. 61:116P
- 20.- Bergström S. (1949)
Prostaglandins Kemi. Nord. Med. 42:1465
- 21.- Bergström S., Carlson L., Weeks J. (1968)
Pharmac. Rev. 20:1
- 22.- Bergström S., Danielson H., Samuelsson B. (1964)
Biochim Biophys Acta 90:207
- 23.- Bergström S., Krabich L., Sjövall J. (1960)
Acta Chem Scand. 14:1706
- 24.- Bergström S., Ryhage R., Samuelsson B., Sjövall J. (1963)
J. Biol. Chem. 238:3555
- 25.- Bergström S., Sjövall J. (1957)
Acta Chem Scand. 11:1086

- 26.- Bergström S., Sjövall J.(1960)
Acta Chem Scand 14:1693
- 27.- Bergström S.,Sjövall J.(1960)
Acta Chem Scand 14:1701
- 28.- Bergström S., Sjövall J. (1962)
Acta Chem Scand 16:969
- 29.- Berridge M.J. (1980)
Trends in Pharmac. Sci. 1:419
- 30.- Berthelsen S.,Pettinger W.A. (1977)
Life Sci. 21:595
- 31.- Bhakoo H.S.,Katzenellenbogen B.S. (1977)
Mol. Cell. Endocrinol. 8:121
- 32.- Bito L.Z. (1975)
Prostaglandins 9:851
- 33.-Bloom W.,Fawcett D.W.
Tratado de Histología (Ed. Labor) 6^{ed} (1973)
- 34.- Bönisch H. (1978)
Naunyn Schmiedeberg Archiv. Pharmacol. 303:121
- 35.- Bönisch H. Trendelemburg U. (1979)
Naunyn Schmiedeberg Archiv Pharmacol 306:229
- 36.- Borda E.,Savage J.,Sterin-Borda L.,Gimeno M.,Gimeno A.(1979)
Europ. J. Pharmacol. 56:61
- 37.- Boyle F.,Digges K. (1982)
Naunyn Schmiedeberg Archiv Pharmacol. 321:56
- 38.- Bozler E. (1941)
Biol Symposia 3:95

- 39.- Brenner R.P. (1976)
Acta Physiol.Latinoam. 26:453
- 40.- Brenner R.M.,West N.B.,Norman R.D.,Sandow B.A.
Verhage H.G. (1979)
Adv.Exp.Med.Biol. 117:173
- 41.- Brody M.J.,Kadowitz P.J. (1974)
Fed. Proc. 33:48
- 42.- Bülbbring E. (1979)
Br. Med. Bull. 35(3):48
- 43.- Bunting S.,Gryglewski R.,Moncada S.,Vane J.R. (1976)
Prostaglandins 12:897
- 44.- Burnstock G. (1979)
Br.Med.Bull 35(3):255
- 45.- Burnstock G.,Holman M.E. (1962)
J.Physiol.(Lond) 160:446
- 46.- Bydgeman M. (1965)
Acta Physiol Scand. 63:56(suppl)
- 47.- Cardinali D.P.,Ritta M.N. (1983)
Neuroendocrinology 36:152
- 48.- Cardinali D.P.,Ritta M.N.,Speziale N.S.,Gimeno M. (1979)
Prostaglandins 18:577
- 49.- Carlsson A.,Hillarp N.A.,Waldeck B. (1963)
Acta Physiol Scand 59:1(Suppl.215)
- 50.- Castracane D.V.,Jordan C.V. (1975)
Biol. Reprod. 13:587
- 51.- Clark J.H.,Gorski J. (1970)
Science 169:76

- 52.- Cockcroft S. (1982)
More About Receptors. Current Reviews in Biomedicine 2
ed. Lambie J. Elsevier Biomedical Press pp.162
- 53.- Coleman R.A., Kennedy I., Levy G.P. (1980)
- 54.- Cornish E.J., Goldie R.G., Miller R.C. (1978)
- 55.- Creed K.E. (1971)
Br. Med Bull. 35:(3)243
- 56.- Csapo A.I. (1959)
Am. NY Acad. Med. 75:790
- 58.- Cubbeddu L.X., Barnes E.M., Langer S.Z., Weiner N. (1974)
J. Pharmacol. Exp. Ther. 190:431
- 59.- Dahlöf C., Ljung B., Ablad B. (1978)
Eur. J. Pharmacol. 50:75
- 60.- Danon A., Assouline G. (1978)
Nature 273:552
- 61.- Dey S.K., Hoversland E.C., Johnson L.C. (1982)
Prostaglandins 23(5):619
- 62.- di Rosa M., Pérsico P. (1979)
Br. J. Pharmacol. 66:161
- 63.- Döhler K.D., Wuttke W. (1975)
Endocrinology 97:898
- 64.- Douglass W.W., (1968)
Neuropharmacology 4:125

- 65.- Dusting G.J., Moncada S., Vane J.R. (1977)
Prostaglandins 13:3
- 66.- Eakins E. (1971)
Ann. NY Acad. Sci. 180:387
- 67.- Eckert E., Henseling M., Trendelenburg U. (1976)
Naunyn Schmiedeberg Archiv. Pharmacol. 293:115
- 68.- Farris E.J., Griffith J.Q. (1949)
The rat in Laboratory Investigation.
2nd ed. J.B. Lippincott pp35
- 69.- Ferreira S.H., Vane J.R. (1967)
Nature 216:868
- 70.- Fiebig E.R., Trendelenburg U. (1978)
Naunyn Schmiedeberg Archiv Pharmacol. 303:21
- 71.- Fiebig E.R., Trendelenburg U. (1978)
Naunyn Schmiedeberg Archiv. Pharmacol 303:37
- 72.- Flack E. Owman., (1969)
Endocrinology 84:958
- 73.- Flower R.J., Blackwell G.J. (1979)
Nature 278:456
- 74.- Flower R.J., Cheung H.S., Cushman D.W. (1973)
Prostaglandins 4:325
- 75.- Flower R.J., Gryglewski K., Herbaczynska L., Vane J.R. (1972)
Nature New Biol. 238:104
- 76.- Foster P.S., Goldie R.G., Paterson J.W. (1983).
Br. J. Pharmacol 78:441
- 77.- Frame M.H., Hedqvist P. (1975)
Br. J. Pharmacol 54:189

- 78.- Franchi A.M., Bonacossa A., Gimeno M., Gimeno A. (1982)
Prostaglandins 23(6):819
- 79.- Fry G.N., Devine C.E., Burnstock G. (1977)
J. Cell. Biol. 72:26
- 80.- Gabella G. (1977)
Cell. Tissue Res. 184:195
- 81.- Gabella G. (1979)
Br. Med. Bull. 35(3):213
- 82.- Ganström E., Samuelsson B. (1971)
J. Biol. Chem. 246:5254
- 83.- Gilmore N., Vane J.R., Wyllie J.H. (1968)
Nature 218:1135
- 84.- Gillespie J.S., Kerpekar S.M. (1965)
J. Physiol (Lond) 176:205
- 85.- Gimeno M., Bednars A.S., Goldraij A., Gimeno A. (1970)
Acta Physiol Latinoam. 20:275
- 86.- Gimeno A., Chaud M., Bonacossa A., Franchi A., Gimeno M. (1983)
Prostaglandins 26(4):663
- 87.- Gimeno M., Gimeno A., Lima F., Borda E. (1973)
Acta Physiol Latinoam. 23:105
- 88.- Gorski J., Gannon F. (1976)
Ann. Rev. Physiol. 38:425
- 89.- Graefe K.H., Trendelenburg U. (1974)
Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmac. 286:1
- 90.- Grand R.J., Perry S.V., Weeks R.A. (1979)
Biochem J. 177:521

- 91.- Grassé P.
Traité de Zoologie. Tomo XVI, fasc.VI (Masson et Cie.Eds.)
Paris (1969)
- 92.- Gryglewski R.J., Bunting S., Moncada S. Flower R.J.
Vane J.R. (1976)
Prostaglandins 12:685
- 93.- Gryglewski R.J., Panczenko B., Korbut R., Grodzinska L.,
Ocetkiewicz (1975)
Prostaglandins 10(2):343
- 94.- Guellaen G., Aggerbeck M., Hanoune J. (1979)
J.Biol.Chem 254:10761
- 95.- Guyton A.
Tratado de Fisiología Médica. Interamericana (1977)
- 96.- Ham E.A., Cirillo V.J., Zanetti M.E., Kuehl J.R. (1975)
Proc.Natl.Acad.Sci USA 72(4):1420
- 97.- Hamberg M. (1968)
Eur.J.Biochem 6:135
- 98.- Hamberg M., Samuelsson B. (1973)
Proc.Natl.Acad.Sci USA 70:899
- 99.- Hamberg M., Samuelsson B. (1971)
JBiol. Chem. 246:1073
- 100.- Hamberg M., Samuelsson B. (1971)
J.Biol.Chem 246:6713
- 101.- Hamberg M., Samuelsson B. (1974)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 61:942
- 102.- Hamberg M., Samuelsson B. (1974)
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 71:3400

- 103.- Hamberg M.,Svensson J.,Samuelsson B. (1975)
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 72:2994
- 104.- Hamberg M.,Svensson J.,Wakabayashi T.,Samuelsson B. (19774)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 71:345
- 105.- Hamberger B.,Malmfors T.,Norberg K.,Sachs C. (1964)
Biochem Pharmacol 13:841
- 106.- Hamberger B.,Norberg K.,Olson L.(1967)
Acta Physiol Scand. 69:1
- 107.- Hardin J.W.,Clarck J.H.,Glasser S.R.,Peck E.J. (1976)
Biochemistry 15:1370
- 108.- Harper M.K.J. (1964)
J.Endoc. 30:1
- 109.- Hartshorne D.J. (1980)
Chest 78:1 suppl
- 110.- Head J.F.,Weeks R.A.,Perry S.V. (1977)
Biochem J. 161:465
- 111.- Hedqvist P. (1968)
Acta Physiol Scand 74:7A
- 112.- Hedqvist P.(1970)
Acta Physiol Scand. 80:269
- 113.- Hedqvist P.,Brundin J. (1969)
Life Sci. 8(1):389
- 114.- Henseling M (1978)
Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmac. 302:R50
- 115.- Henseling M.,Eckert E.,Trendelenburg U. (1976)
Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol 292:205
- 116.- Henseling M.,Rechtsteiner D.,Trendelenburg U. (1978)
Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol 30:181

- 117.- Hervonen A., Kanerva L., Lietzen R., Partanen S. (1972)
Acta Physiol Scand. 85:283
- 118.- Hirata F. (1981)
J. Biol Chem. 256(15):7733
- 119.- Hoar W.S.
Fisiología general y Comparada. Ed Omega S.A. España
pp767 Cáp.22
- 120.- Hoffman B.B., Lefkowitz R.J. (1980)
Ann. Rev. Pharmacol 20:581
- 121.- Holaday D.A., Volk M., Mandell J. (1958)
A, J Physiol. 195:505
- 122.- Holman M.E., Neild T., (1979)
Br. Med. Bull. 35:235
- 123.- Horton E., Poyser N. (1976)
Physiol. Rev. 56:595
- 124.- Hsue A.J., Clark J. (1976)
Endocrinology 98:438
- 125.- Hsue A.J., Peck E.J., Clark J. (1976)
Endocrinology 98:438
- 126.- Hsue A.J., Isakson P.C., Needleman P. (1977)
Prostaglandins 13:1073
- 127.- Hughes J. (1972)
Br. J. Pharmacol 44:472
- 128.- Iversen L.L. (1965)
Br. J. Pharmacol. 25:18
- 129.- Iversen L.L. (1973)
Br. Med. Bull. 29(2):130

- 130.- Iversen L.L.,Salt P.J. (1970)
Br. J. Pharmacol. 40(3):528
- 131.- Jakobs K.H.,Aktories H.,Schultz G. (1981)
Adv.Cyclic.Res. 14:173
- 132.- Jakobs K.H.,Schultz G. (1980)
Trends in Pharmacol. Sci. 1:133
- 133.- Jakobs K.H.,Schultz G. (1982)
J.of Cardiovasc. Pharmacol. 4:563
- 134.- Jensen E.V.,De Sombre E.R. (1972)
Ann.Rev. Biochem. 41:203
- 135.- Johnson R.A.,Morton D.R.,Kinner J.H.,Borman R.R.
McGuire J.C.,Sun FF (1976)
Prostaglandins 12:915
- 136.- Junstad M.,Wennmalm A. (1973)
Acta Physiol Scand. 87:573
- 137.- Kadowitz P.J.,Sweet C.S.,Broody M.J. (1971)
J.Pharmacol Exp.Ther 176:167
- 138.- Kalsner S. (1969)
Br.J.Pharmacol. 36:582
- 139.- Kanerva L.,Mustonen T.,Teravainen H. (1972)
Acta Physiol Scand. 86:159
- 140.- Katzenellenbogen B.S. (1980)
Ann. Rev.Physiol 42:17
- 141.- Kauman A.J. (1972)
Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol 273:134
- 142.- Kirton K.T.,Gutknecht G.D.,Bergström K.,Wyngarden L.,
Forbes A.A.(1972)
J.Reprod.Med. 9:266

- 143.- Kopin I.J., Silberstein S.A. (1972)
Pharmacol.Rev. 24:245
- 144.- Krall J.F., Mori H., Tuck M.L., Leshon S.L., Korenman J.G. (1978)
Life Science 23:1073
- 145.- Ku E.C., Wasvary J.M. (1973)
Fed. Poc. 32:3302
- 146.- Kuhel F.A jr. (1974)
Prostaglandins 5:325
- 147.- Kuhel F.A., Cirillo M., Zanetti M.E., Beveridge G.C. Ham E. (1976)
Adv. in PG y Tx research 1:313
- 148.- Kuhel F.A., Ham E., Cirillo M. (1972)
Intro Science Chem Rept 6:(1)85
- 149.- Kuhel F.A., Hu, es J.L. (1972)
Proc.Natl.Acad. Sci. 69:480
- 150.- Kunze H., Vogt W. (1971)
Ann.NY Acad.Sci. 180:123
- 151.- Kurzok R., Lieb C.C. (1967)
Proc. Soc. Exp.Biol.Med 26:268
- 152.- Lan N.C., Katzenellenbogen B.S. (1976)
Endocrinology 98:220
- 153.- Lands A.M., Arnold A., Mc Auliff J.P., Luduena F.P.
Brown T.G. (1967)
Nature (Lond) 4:419
- 154.- Lands W.E., Le Tellier P.R., Ronie L.H.
Vanderhoek J.Y. (1972)
Fed.Proc. 31:476
- 155.- Langer S.Z. (1970)
J.Physiol (Lond)

- 156.- Langer S.Z. (1977)
Br.J.Pharmacol 60:481
- 157.- Leaver H.A., Poyser N.L. (1981)
J.Reprod.Fert. 61:325
- 158.- Lee C., Jacobseon H.I. (1971)
Endocrinology 88:596
- 159.- Lee S.C., Levine L. (1975)
J.Biol Chem 250:548
- 160.- Lefkowitz R.J., Caron M.G., Michell T., Stadel J.M. (1982)
Fed. Proc. 41:(10)2664
- 161.- Lenhinger
Bioquímica. Ed.Omega p.820 (1978)
- 162.- Lewis G.P., Piper P.J. (1975)
Nature (London) 254:308
- 163.- Lima F., Gimeno M., Goldraij A., Bedners A., Gimeno A. (1971)
Life Science 10:999 part I
- 164.- Long J.A., Evans H.W. (1949)
The oestrus cycle en the rat and its associated phenomena
en: The rat in laboratory investigation pp 52
- 165.- Lowry O.H., Rosebrough J.N., Farr A.L., Randall R.J. (1951)
J.Biol.Chem. 193:265
- 166.- Luck I.N., Gschwendy M., Hamilton T.H. (1973)
Nature New Biol(Lond) 245:25
- 167.- Malet C., Scherrer J.M., Saavedra J.M., Dray F. (1982)
Brain Research 236:227
- 168.- Malik K., Mc Giff J.C. (1975)
Circ. Res. 36:599

- 169.-Mark J.S.(1956)
Anat.Rec. 125:473
- 170.- Marshall J.M. (1962)
Physiol Rev. suppl.(5) pp213
- 171.- Marshall J.M. (1973)
Ann.Rev.Pharmacol. 13:19
- 172.- Marshall J.M. (1981)
Am.J.Physiol. 240:(cellPhysiol 9) C165
- 173.- Mc Giff J.C.,Cronshaw K.,Terraagno N.,Lonigro A.(1972)
Nature 227:1255
- 174.- Meijs-Roelofs H.M.A.,Greef W.J.,Vilenbroek J.F.H. (1975)
J.Endoc. 64:329
- 175.-Meijs-Roelofs H.M.A.,Vilenbroek J.F.H.,Jong F.H.
Welschen R. (1973)
J.Endoc. 59:295
- 176.- Michell R.H.,Kirk C.J. (1981)
Trends in Pharmacol. Sci. 2:86
- 177.- Miller J.W.(1967)
Ann.NY Acad. Sci. 139:788
- 178.- Minneman K.P.,Pittman R.,Molinoff P.B. (1981)
Ann.Rev.Neurosci. 4:419
- 179.- Miyamoto T.,Ogino N.,Yamamoto S.,Hayaishi O. (1976)
J.Biol.Chem 251:2629
- 180.- Miyamoto T.,Yamamoto S.,Hayaishi O. (1974)
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 71:3645
- 181.- Moawad A.,Hedqvist P,Bydgeman M. (1975)
Acta Physiol Scand. 95:142

- 182.- Moncada S., Bunting S., Mullane K., Thorogood P.,
Vane J.R., Raz A., Needleman P. (1977)
Prostaglandins 13:611
- 183.- Moncada S., Gryglewski R.J., Bunting S., Vane J.R. (1976)
Prostaglandins 12:715
- 184.- Moncada S., Gryglewski R., Bunting S., Vane J.R. (1976)
Nature 263:663
- 185.- Moncada S., Higgs E.A., Vane J.R. (1977)
The Lancet 1:18
- 186.- Moncada S., Needleman P., Bunting S., Vane J.R. (1976)
Prostaglandins 12:323
- 187.- Morera A.M., Audi L., Bertrand J., Saez J.M. (1978) .
J.Steroid Biochem. 9:623
- 188.- Mossman R.G., Conrad J.T. (1967)
Am.J.Obstet.Gynec. 99:539
- 189.- Murphy R.A. (1979)
Ann.Rev.Physiol 41:737
- 190.- Nagai T., Prosser C.L. (1963)
Am.J.Physiol 204:915
- 191.- Nakano J., Anggard E., Samuelsson B. (1969)
Eur.J.Biochem 11:386
- 192.- Needleman P., Moncada S., Bunting S., Vane J.R.
Hamberg M., Samuelsson B. (1976)
Nature 261:558
- 193.- Neil H.V., Rand H.W. (1943)
Comparative Anatomy. Blakiston's Son & Co. USA

- 194.- Neill J.D., Smith M.S.
Pituitary-ovarian interrelationships in the rat.
En Current topics in experimental endocrinology
Eds. James y Martini) Academic Press Inc. pp.73 (1974)
- 195.- Nesci E., Tessitore V.
Dal Bollettino della Societa' Italiana di Biologia
Sperimentale Vol XLVI, Fasc.5 pp.262 (1969)
- 196.- Nissen H., Andersen N. (1969)
Histochemie 17:241
- 197.- Nugteren D.H. (1970)
Biochem. Biophys Acta 210:171
- 198.- Nugteren D.H., Hazelhof E. (1973)
Biochim. Biophys. Acta 326:448
- 199.- O'Donnel S.R., Saar N. (1978)
Br. J. Pharmacol 62:235
- 200.- Oelz O., Oelz R., Knapp H.R., Sweetman B.J. Oates J.A. (1977)
Prostaglandins 13:225
- 201.- Ojeda S.R., Andrews W.W., Advis J.P., Smith White S. (1980)
Endocrine Reviews 1(3):228
- 202.- Pace Asciak C., Morawska K., Wolfe L.S. (1970)
Biochim. Biophys. Acta. 218:288
- 203.- Pace Asciak C., Carrara M.C., Domazet Z. (1977)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 78:115
- 204.- Paiva M.Q., Guimaraes S. (1978)
Naunyn Schmiedeberg's Archiv. Pharmacol. 303:221
- 205.- Paton D.M., Widdicombe J.H., Rheasume D.E., Johns A. (1977)
Pharmac. Rev. 29:67

- 206.- Pedroza García E.,García Biénere W.,Inglesi J.,
Szerezewski A.,Rosner J.M. (1975)
Am.J.Obstet.Gynecol 122(1):96
- 207.- Pinto R.M.,Fisch L.,Schwarcz R.,Montouri E. (1973)
Rev.Soc.Argent.Biol. 39:172
- 208.- Piper P.J,Vane J.R. (1971)
Am.NY Acad. Sci. 180:363
- 209.- Pisano A.,Barbieri F. (1967)
Anatomía comparada de los Vertebrados.Ed. EUDEBA
- 210.- Powell W.S.,Hammaström S.,Samuelsson B. (1974)
Eur.J.Biochem 41:103
- 211.- Powell W.S.,Hammaström S.,Samuelsson B.(1975)
Eur.J.Biochem.56:73
- 212.- Powell W.S.,Hammaström S.,Samuelsson B.,Sjöberg B.(1974)
Lancet 1:1120
- 213.- Prior G.,Schillinger E. (1976)
Adv.in PG and Tx research 1:259
Ed.Samuelsson y Paoletti.Raven Press NY
- 214.- Pulkkinen M.O. (1970)
Acta Obstet.et Gynecologica Scand 49:20
- 215.- Reynolds S.R. (1931)
Am.J.Physiol.97:554
- 216.- Roberts J.,Insel P.,Goldfien R.,Goldfien A.(1977)
Nature 270:624
- 217.- Roberts L.J. Sweetman B.J.,Oates J.A.(1978)
Clin.Res. 26:294A

- 218.- Roberts L.J., Sweetman B.J., Oates J.A. (1978)
J. Biol Chem 253:5305
- 219.- Roth G.A., Stanford N., Majerns P.W. (1975)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72(8):3073
- 220.- Samuelsson B (1963)
J. Am. Chem. Soc. 85:1878
- 221.- Samuelsson B. (1965)
J. Am. Chem. Soc. 87:3011
- 222.- Samuelsson B., Ganström E., Green K., Hamberg M. (1971)
Ann. NY Acad. Sci. 180:168
- 223.- Saniewski M. (1979)
Acta Horticulturæ 91:731
- 224.- Scatchard G. (1949)
Ann NY Acad Sci 51:660
- 225.- Schaub M.C., Watterson J.G. (1981)
Trends in Pharmacol Sci. 2(10):279
- 226.- Schaub M.C., Watterson J.G., Wasser P.G. (1983)
Trends in Pharmacol Sci. 4(3):116
- 227.- Schayer R.W., Smiley R.L., Davis K.J., Kobayashi Y. (1955)
Am. J. Physiol. 182:28J
- 228.- Scheid C.R., Honeyman T.W., Fay F.S. (1979)
Nature 277(4):32
- 229.- Sharma S.C., Garg S.K. (1977)
J. Reprod. Fert. 51:119
- 230.- Shio H., Ramwell P., Andersen N., Corey E. (1970)
Eur. J Biochem 11:386
- 231.- Shorr R., Leftkowitz R., Caron M. (1981)
J. Biol. Chem. 256:5820

- 232.- Silva D.G. (1966)
Anat.Rec. 158:21
- 233.- Sjöberg N.O. (1969)
Acta Obstet.Gynec.Scand. 48:28(suppl3)
- 234.- Small J.V. (1974)
Nature (Lond) 249:324
- 235.- Smith Wl.,Lands W.E. (1971)
J.Biol.Chem. 21:6700
- 236.- Snyder S.H.,Fischer J.,Axelrod J. (1965)
Biochem.Pharmacol 14:363
- 237.- Sokal R.,Rohlf S. (1979)
Biometría. Eds. Blume H. Madrid
- 238.- Sporrang B.,Clase C.,Owman C.,Sjöberg N.O. (1977)
Am.J.Obstet.Gynecol 127:811
- 239.- Starke K. (1977)
Rev.Physiol Biochem Pharmacol 77:1
- 240.- Sterin-Speziale N.,Gimeno M.,Bonacossa A.,Gimeno A. (1980)
Prostaglandins 20:233
- 241.- Stjärne L. (1972)
Acta Physiol Scand.86:574
- 242.- Stjärne L. (1973)
Prostaglandins 3:421
- 243.- Stjärne L.,Gripe K. (1973)
Naunyn Schmiedeberg's Archiv Pharmacol. 280:441
- 244.- Stjärne L.,Lishajko F. (1967)
Biochem Pharmacol 16:1719
- 245.- Story D.F.,Briley M.S.,Langer S.Z. (1979)
Eur.J.Pharmacol 57:423

- 246.- Sun F.F. (1977)
Biochem.Biophys. Res. Commun. 74:1432
- 247.- Sun F.F., Taylor B.M. (1978)
Biochemistry 17:4096
- 248.- Sutherland E.W., Robinson G.A. (1966)
Pharmacol Rv. 18:145
- 249.- Tchernitchin R., Lopez Solis R.O., Cartes Q., Rodriguez A.
Mena M., Unda C. (1980)
Journal of Steroidal Biochem. 13:1369
- 250.- Thaler-Dao, Ramonetxo M., Saintot M., Chaintreuil J.,
Crastes de Paulet A. (1982)
Prostaglandins 24:(2)149
- 251.- Trendelenburg U. (1980)
Rev.of Physiol, Biochem.and Pharmacol. 87:65
- 252.- Urban J., Zasztowt O. (1969)
Pol.Med.J. 8:49
- 253.- Van Dorp A., Beerthuis R., Nugteren D.H., Vonheman H. (1964)
Biochim.Biophys.Acta 90:204
- 254.- Van Rossum J.M. (1963)
Arch.Int.Pharmacodyn Ther 134:299
- 255.- Vanderhoek J.Y., Lands. W. (1973)
Biochim.Biophys.Acta 296:382
- 256.- Vane J.R. (1964)
Br.J.Chemother. 23:360
- 257.- Vane J.R. Williams K. (1972)
Br.J.Pharmac. 45:146 P

- 258.- Vane J.R. (1973)
Br.J.Pharmacol. 48:629
- 259.- Vesin M.F.,Khac L.D.,Harbon S. (1979)
Molec.Pharmacol. 16:823
- 260.- Von Euler U. (1934)
Naunyn Schmiedeberg's Archiv Pathol.Pharmacol.175:78
- 261.- Von Euler U. (1936)
J.Physiol (Lond) 88:213
- 262.- Von Euler U.,Lishajko F. (1969)
Acta Physiol.Scand. 74:501
- 263.- Walaas O.,Walaas.E.,Løken F.(1952)
Acta Endocrinol. 10:201
- 264.- Wennmalm A. (1971)
Acta Physiol Scand 82:suppl 365 pp.1
- 265.- Westfall T.C. (1977)
Physiol Rev. 57:659
- 266.- Whitby L.G.,Axelrod J.,Weil-Malherbe H. (1961)
J.Pharmac.Exp.Ther. 132:193
- 267.- Wilkie D.R. (1956)
Br.Med.Bull. 12:177
- 268.- Willams L.,Lefkowitz R. (1977)
J.Clin. Invest. 60:815
- 269.- Willams L.,Lefkowitz R.
Receptors Binding Studies in Adrenergic Pharmacology
Raven Press NY (1978)
- 270.- Willams T.,Rogers A.W. (1980)
J.Anat. 130:(4)867

- 271.- Wlodawer P., Kindahl H., Hamberg M. (1976)
Biochim. Biophys. Acta 431:603
- 272.- Wong P.Y.K., Sun F.F., Mc Giff J. (1978)
J. Biol. Chem. 253:5555
- 273.- Wood C.L., Caron M.G., Lefkowitz R. (1979)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 88:1
- 274.- Wylie D.W., Archer S., Arnold A. (1960)
J. Pharmacol Exp. Ther. 130:239
- 275.- Zinder O., Pollard H. (1980)
Neuropharmacology 4:125